



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**Tesis de Doctorado**

**“Caracterización de un minibiorreactor con funciones de  
hígado bioartificial: estudios del componente celular y  
variables de operación”**

**Presentada por: Lic. María Dolores Pizarro**

**Director: Dr. Joaquín V. Rodríguez**

**Rosario, Argentina**

**Año 2013**

“Caracterización de un minibiorreactor con funciones de hígado bioartificial:  
estudios del componente celular y variables de operación”

María Dolores Pizarro

Lic. en Biotecnología

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario, y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Cátedra de Farmacología del Departamento de Ciencias Fisiológicas, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, y en el Centro Binacional (Argentina-Italia) de Investigaciones en Criobiología Clínica y Aplicada, dependiente de la Universidad Nacional de Rosario, durante el período comprendido entre el 1 de mayo de 2006 y el 4 de octubre de 2013, bajo la dirección del Dr. Joaquín V. Rodríguez.

*A mis abuelas*  
*A mamá y papá*

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer.....

Al Dr. Joaquín V. Rodríguez, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis bajo su dirección, contribuyendo a mi formación y crecimiento, tanto académico como personal.

A la Dra. María Eugenia Mamprin, por haber sido mi gran guía, mi mentora y sostén, especialmente en los momentos finales de este trabajo. Gracias, Maru, porque sin tu último empujón no hubiese podido cruzar la meta.

A la Dra. Alejandra Quintana, Ale, la reina de la morfología, por enseñarme como se ve “realmente” un senoide dilatado. Por la predisposición, la buena onda, los consejos, las correcciones. Por preocuparte y ocuparte de mí y de esta tesis.

A la Dra. María Gabriela Mediavilla, Gabita, la mente sagaz, por tener siempre el consejo justo y la palabra precisa, por la ayuda invaluable, tanto en lo experimental como en lo humano.

A Ceci, Yiya, Shaky y Vickita, por todos los momentos compartidos, por haber hecho que cada día de trabajo parezca un día de mateada en el parque.

Brujas del alma lo que más agradezco de estos años de tesis es haberlas conocido.

A Angelito “b----”, porque no hubiese podido llevar adelante este trabajo sin su ayuda incondicional en el diseño y armado de los “bales”.

Al Dr. Edgardo Guibert, la Lic. Cecilia Balabán y al resto de los integrantes del CAIC, por los años de mesada compartidos.

A Alejandra Martínez, del Área Morfología, por la dedicación y la excelente labor realizada en el procesamiento de las muestras de tejido aquí presentadas.

Al Dr. Germán Rosano y al Dr. Eduardo Ceccarelli, por la generosa colaboración en los análisis de FPLC.

A la Biblioteca Virtual de Biotecnología para las Américas, en particular a la Sra. Zaida Penton, por la desinteresada posibilidad de acceder a su colección bibliográfica.

En especial a toda mi familia, por apoyarme, soportarme (tarea nada fácil) y ser siempre un gran sostén.

A Luquita, por no desistir en sus palabras de aliento, a pesar de mi terquedad. Por la familia que comenzamos a gestar y por todas las personas maravillosas que gracias a él entraron en mi vida.

A las chichis (en orden alfabético): Ceci, Mari, Mechi, Natis y Romi, por toda una vida de amistad compartida.

A Meli y Mary, por nuestra amistad, el mayor regalo que me ha dado la biotecnología.

A todos aquellos que de una forma u otra me ayudaron en estos últimos años.

Parte de los resultados que se presentan en este trabajo de tesis han sido dados a conocer en:

#### **Revistas científicas internacionales:**

- **Hypothermic preservation of Liver Microorgans (LMOs) in Bes-Gluconate Solution. Protective effects of polyethyleneglycol (PEG) on total water content and functional viability.** Mandolino Cecilia, **Pizarro María Dolores**, Quintana Alejandra, Rodríguez Joaquín and Mamprin María Eugenia (2011), *Annals of Hepatology* 10 (2), 196-206.
- **Protective effects of a carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3) during hepatic cold preservation.** **Pizarro MD**, Rodríguez JV, Mamprin ME, Fuller BJ, Mann B, Motterlini R, and Guibert EE (2009), *Cryobiology* 58, 248-255.
- **Construction and Performance of a Minibioreactor Suitable as Experimental Bioartificial Liver.** Joaquín V. Rodríguez, **María Dolores Pizarro**, Ángel L. Scandizzi, Edgardo E. Guibert, Luciana L. Almada and María E. Mamprin (2007), *Artificial Organs* 32 (4): 323-328.

#### **Congresos nacionales e internacionales:**

- **Pizarro MD**, Berardi F, Scandizzi A, Mediavilla MG, Rodríguez JV, Mamprin ME. "Performance of rat liver microorgans (LMOs) cold preserved in BG35 solution as the biological component of a new flat-plate model of bioartificial liver (BAL)". 49<sup>th</sup> annual meeting of the Society for Cryobiology, Rosario, Argentina, 3 al 6 de junio de 2012. *Cryobiology* 65 (3), 2012, páginas 356-357.
- Berardi F, **Pizarro MD**, Scandizzi A, Mediavilla MG, Tiribelli C, Rodríguez JV, Mamprin ME. "Hypothermic preservation of rat liver microorgans (LMOs) in ViaSpan® and BG35 (Bes-Gluconate-PEG35) solutions. Study of ammonia metabolism during rewarming to evaluate their possible use as biological component of a BAL system". 49<sup>th</sup> annual meeting of the Society for Cryobiology, Rosario, Argentina, 3 al 6 de junio de 2012. *Cryobiology* 65 (3), 2012, página 356.

- **Pizarro, MD**; Mediavilla, MG; Scandizzi, A; Rodríguez, JV and Mamprin, ME. "Development of a new flat-plate model of bioartificial liver (BAL)): its adequacy to liver microorgans (LMOs) as biological component". 2° Taller de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos, Mar de Plata, septiembre de 2011.
- **Pizarro, María Dolores**; Mediavilla, María G; Scandizzi, Ángel L; Rodríguez, Joaquín V; Mischczuk, Gisel; Bellarosa, Cristina; Tiribelli, Claudio y Mamprin, María E. "Preservación hipotérmica de microórganos hepáticos (MOHs) de rata en las soluciones ViaSpan® y BG35 (BES-Gluconato-PEG). Estudio del metabolismo de amonio durante su reoxigenación en un sistema normotérmico vs un modelo de hígado bioartificial (HBA)". LV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). *Revista Medicina* 70 (Supl. II), 2010, página 89, resumen N° 119.
- **Pizarro MD**, Mandolino C, Scandizzi A, Mamprin ME, Rodríguez JV. "Evaluation of the ammonia detoxification efficiency of rat hepatic microorgans used as the biological component of a bioartificial liver: a comparison with the performance of isolated hepatocytes". 1<sup>st</sup> Workshop on Artificial Organs, Biomaterials and Tissue Engineering. *Biocell* 33(3), 2009, A283.
- Mandolino C, **Pizarro M**, Rodríguez J, Mamprin M. "Hypothermic preservation of hepatic microorgans (HMOs) in Bes-Gluconate solution. Protective effects of polyethyleneglycol (PEG) on the total water content and functional viability". 3<sup>rd</sup> Workshop in Cryobiology applied to Medical Science. *Biocell* 33(3), 2009, A238.
- Cecilia Mandolino, **María D. Pizarro**, Gisela Di Venanzio, Joaquín Rodríguez, María E. Mamprin. "Preservación hipotérmica de microórganos hepáticos (MOHs) de rata en solución BGS. Efecto del agregado de polietilenglicoles (PEG)". LIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología. *Revista Medicina* 68 (Supl. II), 2008.

- **Pizarro D**, Rodríguez J, Mamprin M, Fuller B, Motterlini R, Mann B, Guibert E.  
“Protective effect of a carbon monoxide-releasing compound (CORM-3) in cold stored rat livers. A study in the isolated perfused liver model”. 2<sup>nd</sup> Workshop in Cryobiology of Medical Science. *Biocell* 31(3), 2007, 415.



<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. EL HÍGADO.....</b>	<b>6</b>
1.1.1. PRINCIPALES FUNCIONES.....	7
1.1.2. ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL.....	8
<b>1.2. ENFERMEDADES HEPÁTICAS.....</b>	<b>9</b>
1.2.1. FALLA HEPÁTICA AGUDA.....	10
1.2.1.1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	10
1.2.1.2. TRATAMIENTO.....	13
<b>1.3. HÍGADOS BIOARTIFICIALES.....</b>	<b>15</b>
1.3.1. COMPONENTE BIOLÓGICO O BIOCOMPONENTE.....	16
1.3.1.1. TIPOS DE COMPONENTES BIOLÓGICOS.....	16
1.3.1.2. PRESERVACIÓN DEL COMPONENTE BIOLÓGICO.....	19
1.3.1.2.1. Preservación por isquemia fría.....	21
1.3.1.2.2. Soluciones de preservación.....	22
1.3.1.2.3. Agregado de sustancias gasotransmisoras a las soluciones de preservación.....	24
1.3.1.2.4. Evaluación de los efectos de la preservación hipotérmica sobre las funciones metabólicas específicas del sistema biológico preservado.....	26
1.3.1.2.5. Efecto de la preservación hipotérmica y posterior reoxigenación sobre la expresión de genes.....	26
1.3.1.3. FORMAS DE MANTENIMIENTO DEL BIOCOMPONENTE DENTRO DEL BIORREACTOR.....	28
1.3.2. COMPONENTE SINTÉTICO O ARTIFICIAL: EL BIORREACTOR.....	31
1.3.2.1. DIFERENTES DISEÑOS DE BIORREACTORES.....	32
1.3.2.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS FIBRAS HUECAS.....	34
1.3.2.3. EL PROBLEMA DE LA OXIGENACIÓN.....	38
1.3.3. VALIDACIÓN DEL PROTOTIPO DISEÑADO.....	40

1.3.4. APLICACIONES ALTERNATIVAS DE UN BIORREACTOR HEPÁTICO.....	41
1.3.5. ESCALADO Y EVALUACIÓN EN MODELOS ANIMALES.....	42
1.3.6. MODELOS DE HBA EN EVALUACIÓN CLÍNICA.....	43
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
<b>2.1. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>46</b>
<b>2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>46</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>
<b>3.1. ESTUDIOS SOBRE EL COMPONENTE BIOLÓGICO, SU OBTENCIÓN Y PRESERVACIÓN.....</b>	<b>49</b>
3.1.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	49
3.1.2. ESTUDIOS SOBRE LA PRESERVACIÓN HIPOTÉRMICA DE MICROÓRGANOS HEPÁTICOS.....	49
3.1.2.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL GENERAL.....	50
3.1.2.2. OBTENCIÓN Y PRESERVACIÓN DE MICROÓRGANOS HEPÁTICOS (MOHs) DE RATA.....	51
3.1.2.2.1. Hepatectomía.....	51
3.1.2.2.2. Corte de los MOHs.....	51
3.1.2.2.3. Soluciones de preservación utilizadas.....	52
3.1.2.3. REOXIGENACIÓN DE MOHs CONTROLES Y PRESERVADOS.....	53
3.1.2.3.1. Sistema de reoxigenación normotérmica.....	53
3.1.2.3.2. Composición de las soluciones KH utilizadas.....	53
3.1.2.4. ENSAYOS DE VIABILIDAD.....	54
3.1.2.4.1. Ensayo de liberación de LDH.....	54
3.1.2.4.2. Determinación del contenido de glucógeno.....	55
3.1.2.5. ESTUDIOS FUNCIONALES.....	56
3.1.2.5.1. Determinación del consumo de oxígeno.....	57
3.1.2.5.2. Determinación del contenido de agua total.....	58
3.1.2.5.3. Estudios sobre el metabolismo del amonio.....	59

3.1.2.6. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS.....	68
3.1.3. PROFUNDIZACIÓN EN EL ESTUDIO DE LA PRESERVACIÓN HIPOTÉRMICA DE MOHS EN SOLUCIÓN BG35: EVALUACIÓN DEL AGREGADO DE CORM-3.....	68
3.1.3.1. ADICIÓN DE LOS DISTINTOS COMPUESTOS A LA SOLUCIÓN DE PRESERVACIÓN.....	69
3.1.3.1.1. Preparación de CORM-3.....	69
3.1.3.1.2. Obtención de CORM-3 inactivo.....	69
<b>3.2. ESTUDIOS SOBRE EL DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL COMPONENTE ARTIFICIAL.....</b>	<b>69</b>
3.2.1. BREVE DESCRIPCIÓN DEL PRIMER MINIBIORREACTOR DISEÑADO.....	70
3.2.2. PROTOCOLO DE OPERACIÓN DEL SISTEMA.....	70
3.2.3. CARACTERIZACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DE LOS MBRs.....	71
3.2.3.1. MEDICIÓN DEL HEMATOCRITO.....	71
3.2.3.2. CUANTIFICACIÓN DEL GRADO DE HEMÓLISIS.....	72
3.2.3.2.1. Dosaje del contenido de hemoglobina en plasma.....	72
3.2.3.2.2. Cálculo del grado de hemólisis.....	73
3.2.3.3. MEDICIÓN DE LA OSMOLALIDAD DE LAS MUESTRAS.....	73
3.2.3.4. DISTRIBUCIÓN DE AMONIO ENTRE AMBOS COMPARTIMIENTOS DE LOS MBRs.....	73
3.2.3.4.1. Determinación de la concentración de amonio.....	73
3.2.3.4.2. Cálculo del balance de masas de amonio en los MBRs.....	73
3.2.3.5. DISTRIBUCIÓN DE GLUCOSA EN EL SISTEMA.....	74
3.2.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS FIBRAS UTILIZADAS EN LA CONSTRUCCIÓN DE LOS MBRs.....	75
3.2.4.1. ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE AMONIO Y GLUCOSA.....	75
3.2.4.2. DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN DE FILTRACIÓN.....	76
3.2.4.3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR FPLC.....	76
3.2.5. ESTUDIO DE LA PROVISIÓN DE OXÍGENO EN LOS MINIBIORREACTORES.....	77

3.2.5.1. MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO DEL OXIGENADOR INTERNO.....	78
3.2.5.2. DETERMINACIÓN DEL APOORTE DE OXÍGENO POR LA PERFUSIÓN SANGUÍNEA.....	79
3.2.5.2.1. Cuantificación del pasaje de oxígeno desde la sangre hacia el compartimiento biológico.....	80
<b>3.3. ESTUDIOS SOBRE LA VALIDACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LOS MINIBIORREACTORES.....</b>	<b>80</b>
3.3.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL GENERAL.....	80
3.3.1.1. GRUPOS EXPERIMENTALES.....	81
3.3.1.2. REOXIGENACIÓN DE MOHs CONTROLES Y PRESERVADOS.....	81
3.3.1.3. ENSAYOS DE VIABILIDAD.....	81
3.3.1.4. ESTUDIOS FUNCIONALES.....	82
3.3.1.5. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS.....	82
<b>3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....</b>	<b>82</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>83</b>
<b>4.1. ESTUDIOS SOBRE EL COMPONENTE BIOLÓGICO, SU OBTENCIÓN Y PRESERVACIÓN.....</b>	<b>84</b>
4.1.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE OBTENCIÓN DE MOHs.....	85
4.1.2. ESTUDIOS SOBRE LA PRESERVACIÓN HIPOTÉRMICA DE MOHs.....	86
4.1.2.1. EVOLUCIÓN DE LA VIABILIDAD DE MOHs PRESERVADOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN FRÍO.....	87
4.1.2.2. EVOLUCIÓN DE LA VIABILIDAD DE MOHs CONTROLES Y PRESERVADOS 48 H DURANTE LA REOXIGENACIÓN NORMOTÉRMICA.....	89
4.1.2.2.1. Liberación de LDH.....	90
4.1.2.2.2. Evolución del contenido de glucógeno.....	91
4.1.2.3. EVOLUCIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE MOHs CONTROLES Y PRESERVADOS 48 H DURANTE LA REOXIGENACIÓN NORMOTÉRMICA.....	93

4.1.2.3.1. Determinación del consumo de oxígeno.....	93
4.1.2.3.2. Determinación del contenido de agua total.....	95
4.1.2.3.3. Estudios sobre el metabolismo del amonio.....	95
4.1.2.4. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS DE MOHs CONTROLES Y PRESERVADOS 48 H DURANTE LA REOXIGENACIÓN NORMOTÉRMICA.....	100
4.1.3. PROFUNDIZACIÓN EN EL ESTUDIO DE LA PRESERVACIÓN HIPOTÉRMICA DE MOHs EN SOLUCIÓN BG35: EVALUACIÓN DEL AGREGADO DE CORM-3.....	102
4.1.3.1. EVOLUCIÓN DE LA LIBERACIÓN DE LDH.....	103
4.1.3.2. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE OXÍGENO.....	104
4.1.3.3. ANÁLISIS SOBRE LA DETOXIFICACIÓN DE AMONIO.....	106
<b>4.2. ESTUDIOS SOBRE EL DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL COMPONENTE ARTIFICIAL.....</b>	<b>110</b>
4.2.1 DESCRIPCIÓN DE LA ARQUITECTURA Y PARÁMETROS FUNCIONALES DE LOS MINIBIORREACTORES UTILIZADOS.....	111
4.2.1.1. PRIMER MBR DISEÑADO.....	111
4.2.1.2. MODIFICACIONES INTRODUCIDAS AL DISEÑO ORIGINAL.....	112
4.2.1.3. MBR DE BASE PLANA.....	114
4.2.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS DISTINTAS FIBRAS UTILIZADAS.....	116
4.2.2.1. FIBRAS DE CELULOSA REGENERADA.....	117
4.2.2.2. FIBRAS DE POLISULFONA.....	118
4.2.2.3. FIBRAS DE POLYAMIX™.....	119
4.2.2.4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR FPLC.....	120
4.2.3. ESTUDIO DE LA PROVISIÓN DE OXÍGENO EN LOS MINIBIORREACTORES.....	122
<b>4.3. ESTUDIOS SOBRE LA VALIDACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LOS MINIBIOREACTORES.....</b>	<b>124</b>
4.3.1. ESTUDIOS SOBRE EL DESEMPEÑO DE MOHs FRESCOS EN EL MBR CILÍNDRICO. COMPARACIÓN CON EL SRN.....	125

4.3.2. ESTUDIOS SOBRE EL DESEMPEÑO DE MOHs FRESCOS Y PRESERVADOS 48 H EN EL MBR DE BASE PLANA.....	128
4.3.3. COMPARACIÓN DEL DESEMPEÑO DE MOHs FRESCOS Y HEPATOCITOS RECIÉN AISLADOS COMO COMPONENTE BIOLÓGICO EN NUESTROS MODELOS DE MBR.....	134
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>136</b>
<b>5.1. CONCLUSIONES PARCIALES.....</b>	<b>137</b>
<b>5.2. CONCLUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>139</b>
<b>6. RESUMEN.....</b>	<b>141</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>146</b>

# ABREVIATURAS

---

---

Abs	Absorbancia
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico copia
ADP	Adenosina difosfato
AMC-BAL	<i>Academic Medical Center – BioArtificial Liver</i> , Hígado Bioartificial del Centro Médico Académico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosomal
ATP	Adenosina trifosfato
BES	Ácido N, N- bis (2- hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico
BLSS	<i>Bioartificial Liver Support System</i> , Sistema de Soporte Hepático Bioartificial
Cb	Compartimiento biológico
CORM	<i>CO Releasing Molecules</i> , Moléculas Liberadoras de CO
CORM-3	Glicinato de Tricarbonilcloro rutenio (II)
CPSI	<i>Carbamoyl Phosphate Synthetase I</i> , Carbamil Fosfato Sintetasa I
dNTP	Desoxirribonucleotidos trifosfato
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético.
EEC	Espacio Extracapilar
EIC	Espacio Intracapilar
ELAD	<i>Extracorporeal Liver Assist Device</i> , Dispositivo de Asistencia Hepática Extracorporeal
FHA	Falla Hepática Aguda
FPLC	Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas
GAPDH	Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa
GLDH	Glutamato Deshidrogenasa
GSH	Glutación reducido
HBA	Hígado Bioartificial
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico
HO	Hemo Oxigenasa



---

---

IL	Interleucina
INCUCAI	Instituto Nacional Único Coordinador de Ablación e Implante
kDa	kiloDalton
KH	Solución Krebs-Henseleit
KHA	Solución Krebs-Henseleit Amonio
KHB	Solución Krebs-Henseleit Base
LDH	Lactato Deshidrogenasa
MBR	Minibiorreactor
MELS	<i>Modular Extracorporeal Liver Support</i> , Soporte Hepático Extracorporeal Modular
MOHs	Microórganos Hepáticos
MOPs	Ácido 3-morfolinopropano-1-sulfónico
mOsm	miliosmoles
MWCO	<i>Molecular Weight Cutoff</i> , Valor de Corte de Peso Molecular
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido, forma reducida
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido, forma oxidada
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato, forma reducida
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato, forma oxidada
OTC	Ornitina Transcarbamilasa
pb	Pares de bases
PBS	Tampón de sales fosfato
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PM	Peso Molecular
pO <sub>2</sub>	Presión de oxígeno
RFB	<i>Radial Flow Bioreactor</i> , Biorreactor de Flujo Radial
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno

RT	Transcripción Reversa
Solución BGS	Solución BES-GLUCONATO-SUCROSA
Solución BG 35	Solución BES-GLUCONATO-PEG 35 kDa
Solución UW	Solución de la Universidad de Wisconsin
Solución ViaSpan®	Solución de la Universidad de Wisconsin comercial
SRN	Sistema de Reoxigenación Normotérmica
THO	Trasplante Hepático Ortotópico
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UAbs	Unidades de Absorbancia

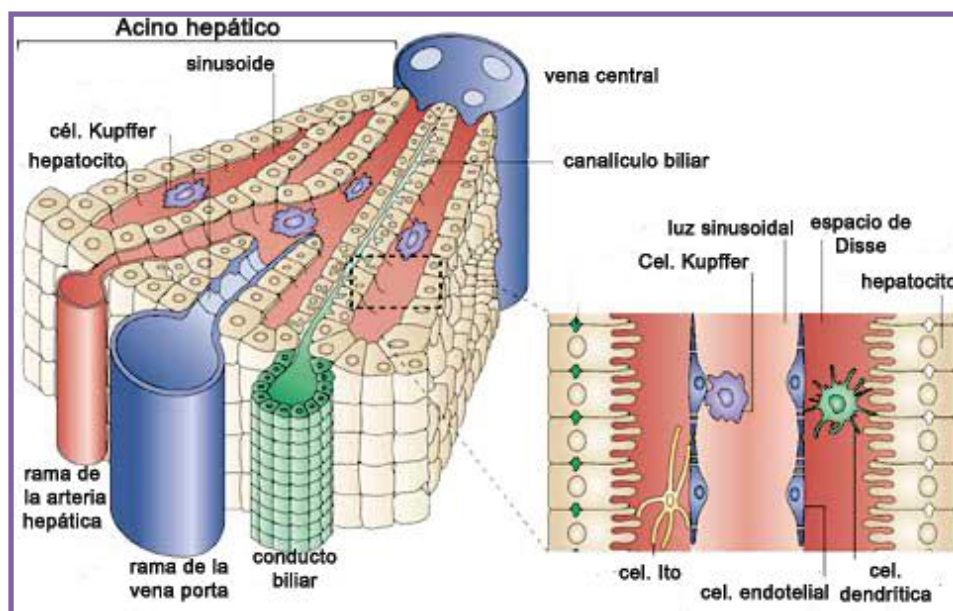
# 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. EL HÍGADO

El hígado es la glándula más grande y la víscera más voluminosa del organismo. Está ubicado principalmente en el hipocondrio derecho, aunque en parte se extiende hacia el hipocondrio izquierdo, y está protegido por la parrilla costal. Se encuentra revestido por una cápsula de tejido conjuntivo fibroso (cápsula de Glisson) y, anatómicamente, se divide en dos lóbulos grandes (derecho e izquierdo) y en otros dos más pequeños (cuadrado y caudado o de Spiegel) [1].

Este órgano recibe su irrigación principal (alrededor del 75 %) de la vena porta, que conduce sangre venosa con poca concentración de oxígeno proveniente del tubo digestivo y de órganos tales como el páncreas y el bazo. La arteria hepática lleva sangre oxigenada al hígado y provee el 25 % restante de su irrigación. La sangre proveniente de las ramas de estos dos vasos sanguíneos se mezcla en los sinusoides hepáticos, justo antes de irrigar a los hepatocitos, por lo que estos nunca quedan expuestos a sangre oxigenada por completo, y es recogida por la vena central (Figura 1) [1].

**Figura 1:** Diagrama del parénquima hepático. Adaptado de D.H. Adams y B. Eksteen. (2006). Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestation of inflammatory bowel disease. Nature Reviews Immunology, 6: 244-251.



### 1.1.1. PRINCIPALES FUNCIONES

El hígado, por las múltiples funciones que cumple, es un órgano de importancia fundamental para la vida. En la Tabla 1, se resumen dichas funciones para ofrecer una visión general de la complejidad funcional hepática [2].

TABLA 1: Principales funciones del hígado

<b>METABOLISMO ENERGÉTICO</b>	Provisión tisular de glucosa y acetoacetato
<b>BIOSÍNTESIS Y BIODEGRADACIÓN</b>	Biosíntesis y degradación de proteínas
	Formación de bilis (excreción de endo y xenobióticos)
<b>CENTRO DE DEFENSA</b>	Fagocitosis de macromoléculas extrañas y agregados macromoleculares
	Eliminación de células tumorales
	Reacción de fase aguda
<b>RESERVORIO DE SANGRE</b>	Almacenamiento activo y pasivo de sangre, mantenimiento del volumen plasmático
<b>METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO</b>	Captación de glucosa y gluconeogénesis
	Síntesis y almacenamiento de glucógeno; glucogenolisis
<b>METABOLISMO PROTÉICO</b>	Degradación de aminoácidos; síntesis de urea
	Síntesis de proteínas (albúmina, proteínas de la coagulación, glucoproteínas, etc.)
<b>METABOLISMO DE LÍPIDOS</b>	Síntesis de colesterol, triglicéridos, fosfolípidos, lipoproteínas y ácidos biliares
	Oxidación de ácidos grasos y cetogénesis
<b>METABOLISMO DEL HEMO</b>	Síntesis del grupo hemo y de porfirinas
<b>METABOLIZACIÓN DE HORMONAS</b>	Modificación de insulina, glucagón, hormona del crecimiento, glucocorticoides, tiroxina, etc.
<b>METABOLIZACIÓN DE XENOBIÓTICOS</b>	Reacciones de oxidación y conjugación
<b>SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE COMPONENTES CELULARES Y EXTRACELULARES</b>	Componentes de membrana, citosólicos y del citoesqueleto
	Componentes de la matriz extracelular
<b>FUNCIONES DE ALMACENAMIENTO</b>	Vitaminas liposolubles (A, D, K), vitamina B12, minerales (hierro, cobre)
<b>FUNCIONES RETICULOENDOTELIALES</b>	Fagocitosis, procesamiento de antígenos.
<b>METABOLISMO DE PROTECCIÓN</b>	Secuestro de especies reactivas del oxígeno y de intermediarios electrofílicos

Todas las funciones hepáticas descriptas son llevadas a cabo por las células parenquimatosas del hígado, los hepatocitos, y por al menos cuatro tipos de

células no parenquimatosas: las células endoteliales sinusoidales y las células de Kupffer, de Ito y Pit [3].

### **1.1.2. ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL**

Entre los componentes estructurales y funcionales del hígado se encuentran (ver Figura 1) [1]:

- Parénquima: consiste en trabéculas de hepatocitos bien organizadas, que en el adulto tienen una sola célula de espesor y están separadas por capilares sinusoidales. Los **hepatocitos** representan casi el 65 % del número total de células y el 90 % de la masa del hígado. Tienen forma poliédrica y polaridad en sus funciones; dependiendo de su orientación en el hígado los hepatocitos contribuirán en forma diferente a los procesos metabólicos [3,4]. Desde el punto de vista bioquímico, son las células más complejas del cuerpo humano y tienen un rol importante en el catabolismo y anabolismo de carbohidratos, aminoácidos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Los hepatocitos participan, también, en la activación o inactivación de sustancias tóxicas extrañas [5].
- Estroma de tejido conjuntivo: se continúa con la cápsula fibrosa de Glisson y alberga vasos sanguíneos, nervios, vasos linfáticos y conductos biliares.
- Capilares sinusoidales o sinusoides: son los vasos que irrigan las trabéculas de hepatocitos. Revistiendo dichos sinusoides se encuentran las **células endoteliales**, que constituyen el 20% de las células hepáticas. Las mismas presentan fenestraciones que permiten el contacto directo de los hepatocitos con la mayoría de las proteínas plasmáticas en el espacio de Disse. Conforman una barrera física que previene la interacción directa de los hepatocitos con células sanguíneas, grandes quilomicrones, virus y bacterias [6]. Además, participan en el transporte activo de sustancias entre los sinusoides y el espacio de Disse, la coagulación, la fibrinólisis, la reacción inflamatoria, la respuesta inmunitaria, la regulación de la presión sanguínea, el metabolismo de lípidos, y poseen capacidad endocítica [7]. En la luz sinusoidal se encuentran las **células de Kupffer**, que representan

aproximadamente el 10 % de la población celular del hígado y constituyen entre el 80 y 90 % de los macrófagos fijos del sistema retículo endotelial [6]. Sus funciones son la fagocitosis de glóbulos rojos, bacterias, etc., la pinocitosis, el metabolismo de lípidos, la degradación de hepatocitos seniles, la degradación de hemoglobina, el almacenamiento de hierro y el catabolismo de enzimas [7]. Las **células Pit** constituyen otro tipo celular residente de los sinusoides hepáticos. Representan la única población de células Natural Killer del hígado; tienen actividad citotóxica contra células tumorales y células infectadas por virus y, con frecuencia, se adhieren a las células endoteliales [8].

- Espacios perisinusoidales o de Disse: están situados entre el endotelio sinusoidal y los hepatocitos. Albergan un tipo de células no parenquimatosas, las denominadas **células de Ito**, que representan entre un 5 y un 13 % de la población celular hepática. Las mismas, además de almacenar algunos lípidos, poseen un efecto regulador sobre el flujo sanguíneo a través de la contracción y dilatación del lumen sinusoidal en respuesta a endotelinas, angiotensinas, tromboxanos o prostaglandinas; y estarían involucradas en el desarrollo y regeneración del tejido hepático [9,10].

## **1.2. ENFERMEDADES HEPÁTICAS**

El término “enfermedad hepática o hepatopatía” se aplica a muchas enfermedades y trastornos, como hepatitis virales, desórdenes hepáticos relacionados con el alcohol, cálculos biliares y cáncer, que provocan que el hígado funcione inadecuadamente o deje de funcionar. Las fallas hepáticas pueden ser agudas o crónicas, de acuerdo al tiempo en el cual se extienda su desarrollo. Los mecanismos de estas dos condiciones no son necesariamente los mismos [11].

La Falla Hepática Crónica es la enfermedad hepática más común y aparece de forma progresiva; se asocia generalmente a cambios morfológicos hepáticos conocidos como cirrosis. En este estado, un tejido fibroso reemplaza gradualmente la arquitectura normal del hígado como resultado de la larga exposición a

sustancias tóxicas (por ejemplo, alcohol) o como secuela secundaria a una hepatitis viral. Entre el 60 y el 90% de los pacientes necesita trasplante hepático para su recuperación [12].

La Falla Hepática Aguda (FHA) es un desorden complejo y devastador, que afecta a pacientes sin enfermedad hepática preexistente. Representa el principal desafío terapéutico para los hepatólogos debido a su rápida progresión y a la alta tasa de mortalidad asociada como resultado de la falla de múltiples órganos [13].

### **1.2.1. FALLA HEPÁTICA AGUDA**

La Falla Hepática Aguda está definida por la aparición de encefalopatía hepática, como consecuencia de un daño hepático severo, en las primeras 8 semanas que siguen a la presentación de los síntomas clínicos, en individuos sin enfermedad hepática previamente manifiesta [14]. Los pacientes con FHA pueden presentar inestabilidad hemodinámica, edema cerebral, susceptibilidad a infecciones, falla renal, coagulopatías y, con frecuencia, profundos disturbios metabólicos [15].

Entre las principales causas de FHA podemos mencionar: infección por virus hepatotropos (de hepatitis A, B, C, D y E) y no hepatotropos (herpes virus, citomegalovirus, varicela zóster, entre otros); ingestión de drogas y toxinas (paracetamol, tetracloruro de carbono, venenos de hongos y plantas, antidepresivos antiinflamatorios no esteroideos, entre otros); ciertos trastornos vasculares como falla cardíaca derecha, y algunas enfermedades metabólicas como hígado graso agudo del embarazo, tirosinemia, entre otras [13,14].

#### **1.2.1.1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS**

Con frecuencia, muchos pacientes con FHA presentan, inicialmente, síntomas no específicos que incluyen fatiga, malestar, anorexia, dolor abdominal, fiebre e ictericia. Estos síntomas progresan hasta el desarrollo de coagulopatía y, posteriormente, encefalopatía; ambos síntomas constituyen el sello distintivo de la FHA. Finalmente, en etapas avanzadas, la FHA con frecuencia involucra la disfunción de múltiples órganos [13].



- **Coagulopatía**

El hígado cumple un rol central en la síntesis de la mayoría de los factores de coagulación y de algunos inhibidores de la coagulación y la fibrinólisis. Por ello, es frecuente que pacientes con FHA presenten deficiencias de fibrinógeno, factores II, V, VII, IX y X, y de plaquetas, y reducción en los niveles de antitrombina, proteína C y proteína S. Estos desbalances se manifiestan en el incremento del tiempo de protrombina, test bioquímico ampliamente utilizado como indicador de la severidad de la injuria hepática [13].

- **Encefalopatía hepática**

La encefalopatía hepática es un síndrome neuropsiquiátrico complejo, caracterizado por un espectro amplio de alteraciones en el estado mental que van desde cambios sutiles en la conducta hasta el estupor, el delirio y el coma [13,14]. Se trata de un trastorno reversible, ya que sus síntomas mejorarán o desaparecerán si la disfunción hepática mejora o si el paciente es sometido a un trasplante hepático [16].

La patogénesis de la encefalopatía hepática es compleja y, en parte, desconocida. Tradicionalmente, se la consideró secundaria a la acumulación de un agente tóxico que no ha podido ser adecuadamente metabolizado por el hígado. La naturaleza de este agente tóxico circulante se ha constituido en un tema controversial desde 1970. Una gran variedad de toxinas han sido incriminadas, entre las que se encuentran las benzodiacepinas, los mercaptanos, fenoles y ácidos grasos de cadena corta, los aminoácidos aromáticos, el manganeso y las citoquinas, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6. Sin embargo, la visión general actual es que el amonio juega un rol crítico en este desorden y que los compuestos anteriormente mencionados potenciarían los efectos del mismo [13,15-19].

Incrementos en los niveles circulantes de este metabolito fueron observados, tanto en modelos animales como en pacientes con FHA [18,20]. Bernal y col. encontraron que los niveles arteriales de amonio en pacientes con FHA se correlacionan con el desarrollo de complicaciones cerebrales y que la concentración de amonio en sangre constituye un índice de riesgo para el desarrollo de encefalopatía hepática [18].

Los astrocitos son los encargados de la detoxificación cerebral del amonio, ya que son las únicas células cerebrales que contienen la enzima Glutamina Sintetasa, la cuál cataliza la síntesis de glutamina a partir de amonio y glutamato [17,19]. Se ha observado la aparición de diferentes anormalidades estructurales y funcionales luego de la exposición de cultivos de astrocitos al amonio; además, estas células son las principales células cerebrales que sufren cambios histopatológicos en el desarrollo de encefalopatía hepática. Esto sugiere un rol protagónico del amonio y de sus efectos sobre los astrocitos en la patogénesis de la encefalopatía hepática [17].

- **Edema Cerebral**

El edema cerebral y sus consecuencias, la hipertensión intracraneal y la hernia meníngea, constituyen las complicaciones más severas en pacientes con FHA. Más del 80 % de los enfermos desarrollan estas complicaciones que son, además, responsables de la elevada mortalidad. Su origen se debe tanto a alteraciones de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica como a trastornos metabólicos y enzimáticos, fundamentalmente a nivel de los astrocitos [14].

Al igual que en el caso de la encefalopatía hepática, la patogénesis del edema cerebral no ha sido dilucidada en su totalidad. En varios estudios se ha observado que los astrocitos presentan edema prominente en modelos experimentales de FHA. Biopsias realizadas inmediatamente post-mortem de cerebros de pacientes con FHA también mostraron resultados similares [21]. Por ello, los modelos actuales consideran que esta hinchazón de los astrocitos constituye el componente principal del edema cerebral. La toxicidad del amonio sobre los astrocitos jugaría un rol central, pudiendo también contribuir otros factores [22].

Por todo lo expuesto, podemos inferir que es altamente relevante en pacientes con FHA controlar los niveles sanguíneos de amonio, con el fin de prevenir la aparición de complicaciones cerebrales severas. Además, debe considerarse que podría interrumpirse la progresión de la enfermedad en muchos de estos pacientes al aplicar terapias específicas que reduzcan la concentración de este metabolito.

### 1.2.1.2. TRATAMIENTO

Actualmente, no existe un tratamiento directo y satisfactorio para la FHA. En los diferentes centros de salud, se intenta mantener a los pacientes estables a través del monitoreo y mantenimiento de las funciones vitales, administrando fluidos intravenosos, productos sanguíneos, antibióticos, vasopresores, terapia de reemplazo renal y otros cuidados médicos generales de soporte. Finalmente, el paciente debe recibir un trasplante hepático o, de lo contrario, soportar una hospitalización prolongada con las altas tasas de morbilidad y mortalidad asociadas a la misma [23].

- **Terapia clásica: Trasplante Ortotópico de hígado**

El trasplante hepático ortotópico (THO) consiste en la extirpación del hígado enfermo de un paciente y su sustitución, en la misma localización anatómica, por un hígado sano, procedente de un donante cadavérico. Hasta el momento, constituye la única intervención que ha probado tener efectos beneficiosos en la sobrevida de pacientes con FHA, con un porcentaje de supervivencia luego de 5 años post-trasplante del 72 % [24,25].

En la actualidad, el número de trasplantes hepáticos que se lleva a cabo se mantiene estable, mientras que se sigue incrementando el número de pacientes en lista de espera para un nuevo órgano. Por ello, uno de los principales problemas a los que se enfrenta hoy en día esta terapia lo constituye la escasez de órganos. En nuestro país existe una Lista de Espera Única, centralizada a través del INCUCAI (Instituto Nacional Único Coordinador de Ablación e Implante, dependiente del Ministerio de Salud de la Nación), la cual es permanentemente actualizada [<http://www.incucai.gov.ar>].

Debido a esta escasez de donantes, los tiempos de espera para muchos pacientes se hacen demasiado largos y muchos de ellos se convierten en no aptos para trasplante por el desarrollo de falla de múltiples órganos o de complicaciones infecciosas. Con el fin de evitar estas complicaciones o la muerte de muchos pacientes durante el período de espera, se están evaluando diferentes opciones alternativas al tradicional THO.

- **Terapias alternativas al THO**

Entre las propuestas actuales para afrontar el problema de la escasez de hígados para trasplante podemos mencionar:

*Implantación de órganos marginales:* involucra el uso de hígados provenientes de donantes de edad avanzada, de corazón no batiente, o que han padecido enfermedades transmisibles, entre otros [25].

*División del hígado cadavérico para beneficiar a más de un paciente:* esencialmente, permite llevar a cabo el trasplante hepático en 2 receptores a partir de un único órgano. En general, se implanta el segmento derecho en un recipiente adulto y el segmento lateral izquierdo en un niño [25].

*Trasplante hepático a partir de donante vivo:* esta técnica se ha utilizado con excelentes resultados en el trasplante de padres a hijos, ya que tiene la ventaja de una mayor histocompatibilidad y, además, el riesgo para el adulto donante es mínimo. En el caso de trasplante entre adultos, la operación es más compleja y el riesgo es mayor. A pesar de ello, este tipo de procedimientos se está realizando cada vez en un mayor porcentaje debido a los largos tiempos de espera hasta la llegada de un hígado de donante cadavérico. Las ventajas incluyen el uso de un órgano que se encuentra en mejores condiciones, la reducción de los tiempos de isquemia, la elección del momento ideal para llevar a cabo la cirugía, entre otros [25].

*Xenotrasplante:* involucra el trasplante de órganos obtenidos de una especie en individuos de otra especie diferente. La mayoría de los investigadores se han centrado en el cerdo como potencial especie donante debido al suministro ilimitado y a la posibilidad de modificarlos utilizando técnicas de ingeniería genética y de controlar de manera más sencilla el riesgo de infecciones por un agente transportado en el injerto. Sin embargo, esta estrategia se encuentra todavía en fase experimental y queda un largo camino por recorrer hasta que pueda convertirse en una solución para la escasez de donantes [25].

*Trasplante de hepatocitos:* implica el aislamiento de células hepáticas, que pueden provenir de diferentes especies, y su posterior cultivo o preservación para usos futuros. Se pueden aislar hepatocitos humanos viables de hígados

considerados no aptos para trasplante y las células aisladas de un único órgano pueden ser utilizadas en múltiples receptores. El uso de esta técnica en pacientes con FHA permitiría el reemplazo de parte de las células dañadas y serviría para prolongar la sobrevida del paciente hasta la llegada de un órgano para trasplante o hasta la recuperación y regeneración del hígado dañado [25].

*Uso de soportes hepáticos extracorporales:* involucra la perfusión de la sangre de pacientes con FHA a través de dispositivos extracorporales, con el fin de depurar a la misma de sustancias tóxicas que no pueden ser eliminadas por el hígado y/o de proveer al paciente de productos esenciales que su hígado enfermo no puede sintetizar. El empleo de este tipo de tecnologías, al igual que el trasplante de hepatocitos, tiene como finalidad detener el avance de la patología y controlar el estado de pacientes con FHA [15]. Estos sistemas de soporte hepático temporal pueden dividirse en tres grandes categorías, en función del tipo de componente presente que lleve a cabo las funciones de detoxificación, síntesis y/o regulación: artificiales, biológicos y bioartificiales [26]. Como su nombre lo indica, los soportes hepáticos o hígados bioartificiales podrían proveer a los pacientes con FHA de los beneficios terapéuticos de los sistemas tanto artificiales como biológicos. Por ello, actualmente, es en este campo dónde se están llevando a cabo las principales investigaciones y desarrollos.

### **1.3. HÍGADOS BIOARTIFICIALES**

Como se explicó anteriormente, la FHA es una patología de rápida progresión, asociada con una alta tasa de mortalidad. Actualmente, el único tratamiento efectivo disponible es el THO. Sin embargo, entre un 20 y un 30 % de los pacientes muere a la espera de la llegada de un hígado para trasplante. En muchos de estos pacientes, análisis post-mortem han mostrado la presencia de varios nódulos regenerativos que constituyen intentos del hígado por reponerse a la injuria. Sin embargo, esta regeneración no fue capaz de proveer una masa hepática funcional suficiente con la rapidez necesaria para la supervivencia del paciente [27]. En este escenario, surgen los soportes hepáticos cuyo objetivo es suplir las distintas funciones hepáticas en un grado adecuado para mantener el estado general del

paciente hasta que el propio hígado se regenere o hasta la llegada de un órgano para trasplante [26].

Los hígados bioartificiales (HBA) son dispositivos extracorporales que constan de tejido hepático o de hepatocitos funcionales (el componente biológico o biocomponente), alojados dentro de un biorreactor fabricado por el hombre (el componente sintético o artificial) y separados de la circulación sanguínea por membranas semipermeables [26].

Para poder desarrollar un prototipo que cumpla con éxito las funciones de un hígado bioartificial son varios los factores a tener en cuenta, tanto en lo que respecta al componente biológico como al artificial.

### **1.3.1. COMPONENTE BIOLÓGICO O BIOCOMPONENTE**

Se ha consensuado que el componente biológico ideal para ser utilizado en un HBA debería ser de origen humano, fácil y rápidamente cultivable en altas densidades, y de un fenotipo normal (no maligno). Sus células deberían permanecer en un estado bien diferenciado, por días o semanas, para poder efectuar todas las funciones sintéticas y de detoxificación de un hepatocito maduro. Desafortunadamente, diferenciación y proliferación son las caras opuestas de la continuidad biológica y, por ello, existen problemas en obtener grandes números de hepatocitos polifuncionales [28]. Así, en la búsqueda de ese componente biológico ideal, se han utilizado y evaluado diferentes alternativas, en cuanto al tipo a utilizar y la forma de mantenerlo dentro del biorreactor.

#### **1.3.1.1. TIPOS DE COMPONENTES BIOLÓGICOS**

Una de las claves para el óptimo rendimiento de un HBA es la correcta elección del componente biológico a utilizar. Para ello, resulta esencial conocer las características de los distintos tipos disponibles, que se describirán en esta sección. Cabe aclarar que los biocomponentes actualmente utilizados en la clínica son los hepatocitos primarios, tanto de origen humano como porcino, y la línea celular C3A (ver Tabla 2). Las células madre y los microórganos hepáticos están siendo evaluados como alternativas para un uso futuro en pacientes.

- **Hepatocitos primarios**

Pueden provenir de diversas fuentes, como roedores, conejos, porcinos y humanos. Los hepatocitos provenientes de roedores y conejos son utilizados durante las etapas de investigación y desarrollo, ya que sólo pueden aislarse en pequeña escala. En cambio, los hepatocitos humanos y porcinos son los más utilizados en los dispositivos que se encuentran en evaluación clínica y pre-clínica (ver Tabla 2) [28].

Los hepatocitos primarios humanos constituyen la célula ideal para un HBA, gracias a su elevada capacidad metabólica y a que sintetizan proteínas humanas, reduciendo el riesgo de complicaciones inmunológicas. Sin embargo, debido principalmente a su escasez y a la falta de un método estandarizado para su aislamiento, muchos modelos utilizan células de origen porcino [29,30].

Los hepatocitos porcinos son las células de origen animal más utilizadas en los modelos de HBA por sus semejanzas fisiológicas con los hepatocitos humanos y por la posibilidad de obtener gran cantidad de células a partir de un único órgano, dado el gran tamaño del hígado de cerdo [30]. Las desventajas asociadas a su uso son, principalmente, el riesgo de reacciones anafilácticas y la transmisión de zoonosis. Al respecto, cabe aclarar que están en desarrollo diversas estrategias que buscan superar estos inconvenientes y convertir a los hepatocitos porcinos en un biocomponente más seguro [29]. Existen estudios que han demostrado la ausencia de infección por retrovirus endógenos porcinos en pacientes tratados con modelos que utilizan hepatocitos de cerdo [31,32].

- **Líneas celulares hepáticas humanas**

La disponibilidad de hepatocitos humanos maduros es variable y escasa, ya que usualmente son aislados de hígados que no resultan adecuados para el trasplante. Además, éstas células presentan escasa proliferación *in vitro*. Por ello, existe una urgente necesidad por encontrar una línea celular que mantenga funciones hepáticas altamente diferenciadas y una adecuada capacidad de proliferación [33].

Se están investigando varias líneas celulares derivadas de tumores hepáticos humanos como HepG2, así como líneas celulares inmortalizadas como NKNT-3.

En general, estas líneas celulares proliferan adecuadamente pero sus niveles de funciones hepato-específicas no resultan suficientes [33].

Actualmente, la única línea celular con permiso para ser utilizada en un trial clínico es la línea C3A (ver Tabla 2), la cual tiene mayores niveles de secreción de albúmina y de actividad de citocromo P450 que HepG2, línea de la cual deriva. Sin embargo, posee menor función metabólica que los hepatocitos primarios porcinos, sobre todo en lo que respecta a detoxificación de amonio [29].

- **Células madre y otros progenitores hepáticos**

Desde hace unos años, se ha focalizado la atención en las células madre como fuente alternativa de hepatocitos humanos. Esta fuente potencial incluye a las células madre embrionarias, células madre/progenitores hepáticos y células madre no hepáticas transdiferenciadas, como pancreáticas o hematopoyéticas [28,34]. Varios grupos están tratando de definir qué factores controlan la diferenciación de las células madre en el tipo celular de elección y de esclarecer otras premisas básicas para que su utilización sea una realidad [35,36].

- **Microórganos hepáticos**

El hígado está compuesto de células parenquimatosas y no parenquimatosas. Las primeras realizan la mayoría de las funciones sintéticas y metabólicas, pero está claro que la población de células no parenquimatosas influencia las diferentes funciones celulares *in vivo* [27]. Por ello, se considera que el componente biológico “ideal” para ser aplicado a un HBA debe ser aquel que tenga en su composición todos los tipos de células hepáticas, con el objetivo de obtener una máxima respuesta. Los microórganos hepáticos (MOHs) cumplen con este requisito ya que son cortes de hígado, de unos 400  $\mu\text{m}$  de espesor, que mantienen la microarquitectura básica del lobulillo hepático y, por lo tanto, conservan sus características fisiológicas [37,38].

La preparación de MOHs no requiere el uso de enzimas proteolíticas que interrumpen las interacciones intercelulares y pueden resultar dañinas para las células. Así, el mantenimiento de la heterogeneidad celular y de los contactos célula-célula dentro de la matriz tisular normal permite que este modelo conserve el elevado nivel de organización biológica existente en el órgano entero [39].



Los MOHs pueden ser obtenidos de manera sencilla, usando numerosos métodos que van desde procedimientos de corte manual a dispositivos mecánicos completamente automatizados. La obtención debe realizarse en frío, de modo de reducir el metabolismo celular y la producción de especies reactivas del oxígeno potencialmente tóxicas. Además, deben ser cortados de un espesor que permita la rápida difusión de nutrientes y el intercambio de gases; si son demasiado gruesos ( $>500\text{ }\mu\text{m}$ ) comienzan a mostrar injurias en el centro, donde la difusión de oxígeno se vuelve limitante; mientras que si son demasiado finos ( $<200\text{ }\mu\text{m}$ ) presentan una gran proporción de células dañadas en la superficie comparado con el número de células sanas en el centro. El método de obtención es similar para diferentes especies, incluyendo humanos, lo que hace a este modelo adecuado para realizar estudios inter-especie [39].

Varios grupos de trabajo han utilizado MOHs como biocomponente en sus modelos de HBA desde los primeros años de investigación en este campo [37,38,40]. Durante el desarrollo de este trabajo de tesis también resultó interesante evaluar el uso de MOHs como componente biológico, debido a las características fisiológicas de los mismos y demás aspectos favorables ya descriptos, incluyendo la simplicidad y el bajo costo de su metodología de obtención.

#### **1.3.1.2. PRESERVACIÓN DEL COMPONENTE BIOLÓGICO**

Para lograr que un HBA sea útil como herramienta terapéutica se debe disponer del componente biológico en cantidad y calidad, y en el lugar y tiempo en el que sea necesario. Así, el desarrollo de métodos de preservación adecuados es necesario para mantener viable y funcional al biocomponente de manera de poder utilizarlo clínicamente cuando sea requerido.

El objetivo de la preservación de órganos, tejidos o células es el de mantener las funciones específicas de los mismos tanto como sea posible, con el menor daño celular posible. De acuerdo con las condiciones de temperatura, las técnicas de preservación pueden dividirse en [29,41]:

- **Criopreservación**

La criopreservación de material biológico tiene usualmente lugar en una solución acuosa, con diferentes solutos presentes, y cubre un rango de temperaturas subcero de -80 a -196 °C [42]. Los métodos de congelamiento lento tradicionales involucran el descenso controlado de la temperatura, para lo cuál pueden requerirse caros dispositivos de enfriamiento. Su principal ventaja radica en el uso de bajas concentraciones de agentes crioprotectores, disminuyendo así los riesgos de toxicidad [43].

Dado que la formación de hielo se considera la principal causa de daño durante la criopreservación, ha tomado impulso la Vitricación o criopreservación libre de hielo. Este método involucra el incremento de la concentración de sustancias crioprotectoras hasta el punto en que no exista formación de hielo, ni extracelular ni intracelular, y la muestra entera adquiera un estado de vidrio debido a su alta viscosidad [43]. El proceso de vitricación es simple, rápido y comúnmente involucra la inmersión del contenedor sellado con la muestra directamente en nitrógeno líquido [44].

Ambos métodos han sido utilizados con éxito para la criopreservación de hepatocitos y MOHs [38,45-48], pero aun necesitan ser optimizados en cuanto a supervivencia celular y recuperación de las funciones hepáticas [29].

- **Preservación sub-cero sin congelamiento**

Esta técnica involucra el almacenamiento de células u órganos a una temperatura que se encuentra entre el punto de congelamiento del agua y el de la muestra. Estas condiciones podrían reducir el metabolismo sin el daño debido a la formación de cristales de hielo [41]. A pesar de haber sido utilizada con éxito para preservar tanto el órgano entero como células hepáticas aisladas, no ha tenido gran difusión [41,49,50].

- **Preservación Hipotérmica**

Consiste en el mantenimiento de células, tejidos u órganos en un rango de temperaturas que va de 0 a 4 °C. Podemos distinguir dos técnicas que se usan actualmente en la preservación de órganos: la preservación por perfusión continua y la preservación por isquemia fría o almacenamiento en frío [51]. La preservación

por perfusión continua provee un suplemento de sustrato metabólico y remueve bioproductos, recreando la circulación normal. Mientras que, en la preservación por isquemia fría, el órgano se perfunde *in situ* con una solución de preservación y, una vez extraído, se lo mantiene en la misma solución en frío (entre 0 y 4 °C) hasta ser implantado [52].

La preservación por isquemia fría es más simple y más económica, lo cual la convierte en el método estándar de preservación de órganos para el trasplante clínico [52]. En el caso de su aplicación para la preservación del biocomponente de un HBA, resulta una técnica atractiva por su sencillez y eficacia, ya que ha demostrado mantener de manera efectiva la función del material preservado y permite disponer del mismo rápidamente [29]. Además, nuestro laboratorio ha trabajado por años en esta área. Por todo ello, durante el desarrollo de esta tesis, se ha utilizado la técnica de almacenamiento en frío y se hará hincapié en la misma en esta introducción.

- **Preservación a temperatura ambiente**

En la actualidad, esta técnica está siendo ampliamente explorada dado que satisface los requerimientos de simplicidad, rápida disponibilidad, facilidad de transporte y mantenimiento efectivo de la función celular. Se está evaluando, con resultados alentadores, el uso de una de las principales sustancias componentes del té verde en la preservación de hepatocitos a temperatura ambiente dentro de biorreactores [53].

#### **1.3.1.2.1. Preservación por isquemia fría**

Consiste en el almacenamiento estático de un sistema biológico en frío (0 °C), en anoxia (bajo atmósfera de N<sub>2</sub>) y en una solución especialmente diseñada para tal fin. La hipotermia hace más lento el metabolismo y disminuye la velocidad de degradación, por enzimas intracelulares, de componentes celulares esenciales para la viabilidad celular y de las reacciones catabólicas que dañan los tejidos, lo que retrasa la muerte celular. Además, al reducir la actividad metabólica, el enfriamiento disminuye los requerimientos celulares de energía y, por lo tanto, de ATP, aumentando de este modo la tolerancia a la isquemia [54].

Cabe aclarar que el almacenamiento en frío no combate completamente los efectos de la isquemia y, por ello, la protección hipotérmica es un compromiso entre los beneficios y los daños producidos por el frío. Entre los daños producidos por la isquemia fría sobre el tejido preservado se encuentran: la disminución de los niveles de ATP, la edematización celular, el incremento de los niveles de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) citosólico, la acidosis intracelular, el estrés oxidativo (que se manifiesta principalmente en la reoxigenación), y la expansión del espacio intracelular. Estos cambios bioquímicos condicionan el funcionamiento posterior del tejido y su dimensión depende directamente del tiempo de almacenamiento [55].

#### **1.3.1.2.2. Soluciones de preservación**

Para reducir los efectos nocivos de la isquemia fría y lograr un almacenamiento exitoso es importante el uso de una solución de preservación efectiva, la que debe poseer al menos los siguientes componentes claves [54]:

- Un agente impermeable que reduzca el edema celular.
- Un agente buffer que amortigüe los cambios de pH que tienen lugar durante el almacenamiento en frío.
- Un coloide que actúe como soporte oncótico. El coloide genera una presión oncótica y permite el intercambio de componentes esenciales de la solución, sin que tenga lugar la expansión del espacio extracelular.
- Un agente que disminuya la injuria producida por los radicales libres en la reperfusión.
- Precursores de ATP.

#### *Solución de la Universidad de Wisconsin:*

Esta solución, comercialmente conocida como ViaSpan®, contiene lactobionato como anión impermeable para prevenir el edema celular y rafinosa, que brinda soporte oncótico adicional. Además, contiene fosfato como buffer para regular el pH de la solución que junto con la adenosina sirven como precursores para la producción de ATP [54].

Es la solución más ampliamente utilizada para la preservación de órganos y ha sido aceptada como Gold Standard para la preservación de hígados desde 1989 [51]. En este trabajo de tesis, ViaSpan® ha sido utilizada en su carácter de solución

Gold Standard para comparar la eficacia de los protocolos de preservación diseñados.

Solución BES-GLUCONATO-SUCROSA:

En nuestro laboratorio se ha desarrollado la solución BES-GLUCONATO-SUCROSA (BGS), que ha sido utilizada con éxito en la preservación de hepatocitos aislados. Esta solución incluye tres componentes clave: el gluconato como anión impermeable, la sucrosa como soporte oncótico y BES (ácido N, N-bis (2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico) como agente buffer [56].

La solución BGS constituye una buena alternativa a la solución ViaSpan® y ha mostrado la misma eficacia para proteger a hepatocitos aislados de ratas de los daños que causa la isquemia fría. Además, los hepatocitos preservados en BGS mostraron un mejor índice de actividad respiratoria durante la reoxigenación que aquellos que fueron preservados en solución ViaSpan® [56].

Solución BG35:

Para poder extender el uso de la solución BGS a sistemas como los MOHs y, eventualmente, al hígado entero fue necesario adicionarle un coloide para prevenir la expansión del espacio extracelular que ocurre durante el período de isquemia fría. Se ha descrito que el agregado de polietilenglicol (PEG) podría evitar el edema que sufre un tejido cuando es sometido a isquemia fría y, además, tendría un rol protector contra el estrés producido por la generación de radicales libre del oxígeno [57]. Por ello, nuestro equipo de trabajo utilizó como base la solución BGS y como coloides polietilenglicoles de diferentes pesos moleculares para el desarrollo de una solución que permita preservar de manera eficaz microórganos hepáticos [58].

De las diferentes soluciones desarrolladas, la solución BG35, conteniendo PEG de un peso molecular de 35 kDa, demostró ser la más efectiva para proteger MOHs de rata frente a las injurias de la preservación en frío debidas a la isquemia y a la reoxigenación [58]. Por ello, en este trabajo de tesis se profundizó el estudio de la preservación de MOHs de rata en esta solución BG35, haciendo hincapié en la evaluación del metabolismo del amonio.

### **1.3.1.2.3. Agregado de sustancias gasotransmisoras a las soluciones de preservación**

A pesar de que la preservación hipotérmica es el método más utilizado para el mantenimiento de órganos, células y tejidos, se sabe que la isquemia fría induce algunos efectos deletéreos que pueden resultar en una recuperación deficiente de la viabilidad y funcionalidad celular. En el caso de la preservación de órganos para uso clínico, estas injurias pueden llevar a la falla del trasplante. Por ello, se están desarrollando nuevas estrategias que buscan contrarrestar estos efectos nocivos y mejorar los resultados post-preservación, como el uso de diferentes polímeros que actúen como coloides y de sustancias antioxidantes [57].

Un factor importante que impacta en la viabilidad del sistema biológico preservado es el estrés oxidativo, que ocurre mayormente durante la reoxigenación. La reintroducción de moléculas de oxígeno está caracterizada por la reducción univalente de oxígeno molecular, llevando a la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y al daño directo sobre estructuras celulares, así como a la activación de diferentes vías de señalización celular [57].

Una estrategia para mejorar los métodos de preservación consiste en el uso de sustancias antioxidantes que limiten la producción de ROS durante los períodos tanto de isquemia fría como de reoxigenación y rewarming. Al respecto, destaca el uso de los denominados gases medicinales antioxidantes, como el óxido nítrico, el monóxido de carbono y el sulfuro de hidrógeno, cuyos roles como mensajeros biológicos han sido descubiertos recientemente [59].

Los gases medicinales son moléculas gaseosas de uso farmacéutico, dentro de los que se encuentran gases tradicionales, como el oxígeno y el óxido nitroso, y otros de uso más reciente, como los citados anteriormente. Estos gases pueden ser tóxicos, peligrosos e incluso venenosos a altas concentraciones, pero son seguros y potencialmente terapéuticos a bajas concentraciones, promoviendo la supervivencia y función de órganos, tejidos y células trasplantadas [59].

#### Monóxido de carbono (CO):

En células de mamíferos, este gas es generado fisiológicamente por medio del catabolismo del grupo hemo, catalizado por una familia de hemo oxigenasas,

que pueden ser constitutivas (HO-2) o inducibles bajo diversas condiciones de estrés (HO-1). Existen estudios que han demostrado que tanto el CO generado por HO-1 como el administrado exógenamente tiene efectos citoprotectores y anti-inflamatorios [51].

Se han postulado varios mecanismos posibles para explicar los efectos protectores antioxidantes de CO. Este gas se une al grupo hemo de la Citocromo C Oxidasa en mitocondrias, lo que disminuiría sustancialmente la producción de ROS. Por otro lado, durante la injuria por isquemia fría y reoxigenación, las hemoproteínas dañadas son degradadas y liberan sus grupos hemo. Los grupos hemo libres pueden inducir directamente daño tisular, promoviendo la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares, y también actuarían como fuente de hierro para la reacción de Fenton, que convierte  $H_2O_2$  en radicales hidroxilo más reactivos, los cuales causan severos daños al tejido por propagación de la lipoperoxidación. CO podría evitar esto al prevenir la degradación de hemoproteínas por unión a su grupo hemo [59].

#### Moléculas liberadoras de CO:

Como ya fue establecido, los gases medicinales pueden ser tóxicos o beneficiosos dependiendo de su concentración. Por ello, el uso seguro de estos aditivos en las soluciones de preservación requiere tener un elevado control sobre esta variable. Es así que surge, para el caso del CO, una nueva clase de drogas de uso farmacéutico que se conocen como moléculas liberadoras de CO (CORM, del inglés: CO Releasing Molecules) [60].

Durante el desarrollo de esta tesis se evaluó un nuevo compuesto dador de monóxido de carbono, denominado Glicinato de Tricarbonilcloro rutenio (II) o, simplemente, CORM-3. Dicha sustancia ya había sido evaluada por otros grupos en la preservación hipotérmica de riñón y corazón, observándose un marcado efecto citoprotector, sin existir hasta ese momento información disponible sobre su uso en hígado [61,62].

#### **1.3.1.2.4. Evaluación de los efectos de la preservación hipotérmica sobre las funciones metabólicas específicas del sistema biológico preservado**

Muchos de los efectos deletéreos producidos por la preservación en frío se exacerban y se ponen de manifiesto cuando las células, tejidos u órganos preservados son devueltos a condiciones de oxigenación y temperatura normales (37°C) [55]. Por ello, una vez finalizado el período de almacenamiento en frío, es necesario estudiar la viabilidad y funcionalidad del órgano o tejido en dichas condiciones normales para evaluar la eficacia de los métodos de preservación.

El método elegido en esta tesis fue la reoxigenación normotérmica, que consiste en evaluar el desempeño funcional de microórganos recién cortados (MOHs controles) o preservados, cuando los mismos son incubados en solución tipo Krebs, durante 120 min, a 37 °C y bajo atmósfera de carbógeno.

Este es un sistema más sencillo que el HBA, que permite la determinación rápida de diferentes parámetros funcionales que los MOHs deben conservar para poder desempeñarse como componentes biológicos eficaces.

#### **1.3.1.2.5. Efecto de la preservación hipotérmica y posterior reoxigenación sobre la expresión de genes**

Como ya fue expresado, la técnica de almacenamiento en frío es la más utilizada actualmente para la preservación de órganos, tejidos y células. Si bien se ha profundizado en el mejoramiento de las mismas para mantener órganos y células viables durante un período de tiempo más prolongado, al presente, no hay mucha información acerca de la respuesta génica de las células de mamíferos a las bajas temperaturas y como puede esto afectar el funcionamiento posterior de las mismas [63].

Para la aplicación clínica de un HBA en el tratamiento de pacientes con FHA, el componente biológico debe conservar su capacidad para detoxificar amonio. La principal vía de detoxificación del amonio plasmático es el Ciclo de la Urea, mediante el cual el amonio es convertido en urea, forma en la que es posteriormente eliminado. La mayoría de la ureogénesis tiene lugar en el hígado, el que contiene las cinco enzimas del ciclo. Por lo tanto, resultó interesante estudiar la expresión génica de las principales enzimas que comprenden el Ciclo



de la Urea y, de esta manera, elucidar cambios que puedan producirse en el fenotipo celular durante la preservación a bajas temperaturas y que puedan comprometer la posterior funcionalidad del biocomponente durante la reoxigenación normotérmica.

#### Ciclo de la Urea:

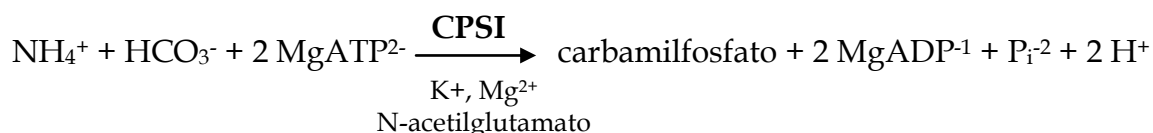
El Ciclo de la Urea fue descrito en 1932 por Krebs y Henseleit, siendo el primer ciclo metabólico elucidado. Sus reacciones individuales fueron descritas por Ratney y Cohen. Ocurre en el hígado, que contiene las cinco enzimas que integran el ciclo: Carbamilfosfato Sintetasa I (CPSI), Ornitina Transcarbamilasa (OTC), Argininosuccinato Sintetasa, Argininosuccinasa y arginasa [64,65].

La velocidad de producción de la urea por el hígado está en relación con la concentración de N-acetilglutamato, metabolito sintetizado a partir de glutamato y acetil-CoA por la N-acetil glutamato sintetasa. Cuando aumenta la degradación de aminoácidos, generando un exceso de nitrógeno que debe ser excretado, se requiere un aumento en la velocidad de síntesis de la urea. Los incrementos en esta tasa de degradación implican un aumento en la concentración de glutamato a través de las reacciones de transaminación. Esta situación, a su vez, provoca un aumento en la síntesis de N-acetilglutamato, estimulando a la CPSI y, por lo tanto, a todo el ciclo de la urea. *In vivo*, se ha demostrado que el paso limitante del ciclo de la urea es el catalizado por CPSI [66,67].

#### Propiedades de la Enzima CPSI:

CPSI es la encargada de mediar el primer paso del ciclo de la urea. Se ubica principalmente en la mitocondria del hígado e intestino delgado. En el hígado, representa entre el 15 y el 30 % de las proteínas totales de la matriz mitocondrial y, aproximadamente, el 4-5% de las proteínas totales hepáticas. Es sintetizada en el citoplasma como un precursor inactivo, el que finalmente es procesado en la matriz mitocondrial. La forma activa de CPSI es un dímero cuyo peso molecular es de aproximadamente 310 kDa [68].

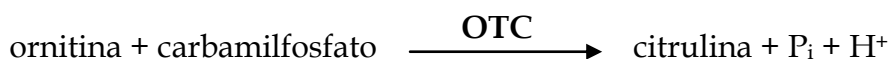
El dador de nitrógeno es el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), que reacciona de manera irreversible con el ion bicarbonato para dar carbamilfosfato, según la siguiente reacción:



Esta enzima usa iones magnesio como cofactor y el N-acetilglutamato actúa como su activador alostérico, induciendo un cambio estructural que aumenta su afinidad por el ATP [66]. En el genoma humano, el gen de la enzima CPSI se ubica en el brazo corto del cromosoma 2 (2q35), mientras que en el de la rata lo hace en el cromosoma 9 (9q34) y da como producto un ARNm de 4503 pb [69].

#### Propiedades de la Enzima OTC:

Al igual que CPSI, OTC es una enzima activa de la matriz mitocondrial y comprende el 3-4 % de las proteínas de la misma. Es un trómero de 108 kDa [66] y media la transferencia del grupo carbamilo del carbamilfosfato a la ornitina, produciendo citrulina.



Esta reacción es reversible, pero se encuentra fuertemente favorecida hacia la formación de citrulina, que luego difunde al citosol donde tienen lugar los últimos tres pasos del ciclo de la urea.

Tanto en el humano como en la rata, el gen de la enzima OTC se encuentra ligado al cromosoma X, pero difieren en la ubicación dentro del mismo (Xp21.1 y Xq13, respectivamente). En la rata, el ARNm tiene un tamaño de 1519 pb [69].

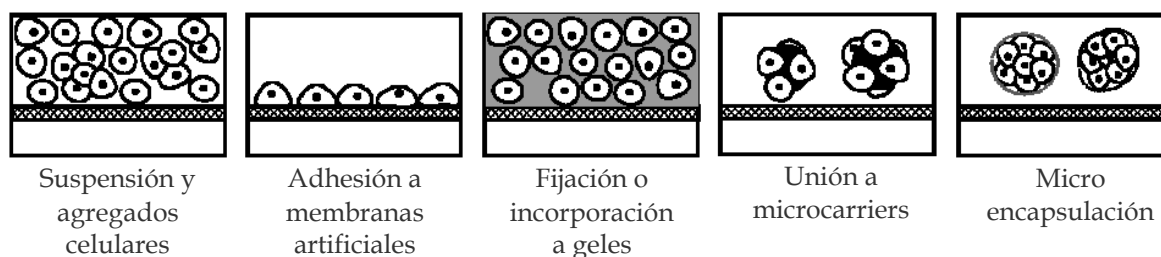
### **1.3.1.3. FORMAS DE MANTENIMIENTO DEL COMPONENTE BIOLÓGICO DENTRO DEL BIORREACTOR**

Otra cuestión importante en el desarrollo de un modelo de HBA, una vez seleccionado el biocomponente a utilizar, es la forma en que el mismo será mantenido dentro del biorreactor. Las distintas técnicas que pueden utilizarse se detallan a continuación y se representan esquemáticamente en la Figura 2 [70].

- **Mantenimiento en suspensión**

El uso de suspensiones de hepatocitos o MOHs, ya sea recién obtenidos o preservados, representa una manera simple, rápida y reproducible de preparar un

HBA. Las suspensiones tienen la ventaja de representar una población homogénea y permitir la carga de una gran cantidad de células o tejido en el biorreactor [70].



**Figura 2:** Representación esquemática de las diferentes formas de mantenimiento del componente biológico dentro del biorreactor (adaptado de Planchamp, C. *et al* [70])

Los hepatocitos en suspensión parecen formar agregados espontáneamente cuando son cultivados en altas densidades dentro de un biorreactor, lo que restauraría las interacciones célula-célula y llevaría a una mejor funcionalidad y viabilidad. [71]. Sin embargo, debe recordarse que, durante su aislamiento, la digestión con colagenasa destruye el glicocáliz y lleva a una modificación de la arquitectura de la membrana. Esto provoca la pérdida de la polaridad celular y puede llevar a la aparición de alteraciones funcionales y estructurales a nivel de cada hepatocito [5]. Además, como los hepatocitos son células anclaje dependiente, su viabilidad y funcionalidad en suspensión está limitada a unas pocas horas luego de su aislamiento. Para extender la sobrevivencia de este tipo celular debe mantenerse en cultivo, unido a algún tipo de soporte [72,73].

- **Adhesión a membranas artificiales**

Para prolongar la funcionalidad y viabilidad del componente biológico, el mismo puede ser cultivado sobre la superficie de alguna membrana. Dado el establecimiento de un contacto directo célula-membrana, la adhesión, el crecimiento y el comportamiento celular dependen de las propiedades superficiales de la misma. En particular, ha sido demostrado que la rugosidad y el tamaño de poro afectan la viabilidad y los índices metabólicos de hepatocitos aislados. Sus características fisicoquímicas, como la existencia de una superficie eléctricamente polar, que presente grupos hidrofílicos, inciden también sobre la correcta adhesión celular [74].

El cultivo celular también puede llevarse a cabo sobre membranas recubiertas con algún material, entre los que pueden encontrarse extractos

solubles de membrana basal (matrigel), colágeno o fibronectina. En este caso, el tipo de componente empleado en el recubrimiento incide sobre las actividades de los hepatocitos. Puede utilizarse el cultivo en monocapa o en configuraciones tipo sándwich, en las que el material biológico se ubica entre dos capas de material polimérico. Este último sistema reproduce en mayor medida la organización histológica normal del hígado y ha permitido obtener mejores resultados, pero se han encontrado dificultades al llevar esta técnica a una mayor escala [73].

Una desventaja importante del uso de esta técnica de cultivo en un HBA es que sólo puede alcanzarse una baja densidad celular [70].

- **Fijación o incorporación a geles**

En este método, una matriz de gel incrementa el área superficial que sirve de soporte, con lo que se consiguen mayores densidades celulares y, por consiguiente, una elevada funcionalidad. Es probable que, a través de la capa de gel, se genere un gradiente pronunciado en las concentraciones de nutrientes y oxígeno, lo que podría causar la muerte celular por falta de alimento o la acumulación de metabolitos tóxicos [70].

- **Unión a microtransportadores**

Los microtransportadores o microcarriers son cuerpos esféricos artificiales que actúan como sustratos para la adhesión celular. Pueden estar hechos de una gran variedad de materiales como dextrán, gelatina, poliestireno, celulosa o vidrio, entre otros [70]. Pueden ser completamente sólidos o porosos, permitiendo el crecimiento celular sobre la superficie o dentro de dichos poros, lo que aumentaría en gran medida la superficie expuesta para el crecimiento celular [75].

Ofrecen una mayor área superficial para la adhesión que las membranas, lo que permite alcanzar mayores densidades celulares. Al igual que las membranas, pueden ser recubiertos con diferentes compuestos, como colágeno, fibronectina o quitosan, compuesto no tóxico, biocompatible y de estructura similar a los glucosaminoglucanos encontrados en la matriz extracelular hepática [70].

- **Micro-encapsulado**

Esta estrategia incluye la incorporación del material biológico dentro de una matriz polimérica o de membranas semipermeables [76]. Provee

inmunoaislamiento, aspecto importante en el caso de uso de un componente biológico de origen xenogénico, y protección contra los daños hidrodinámicos [27]. En el caso de utilizar hepatocitos aislados, la formación de esferoides previo al encapsulado incrementa las interacciones célula-célula y facilita la formación de estructuras tipo conducto biliar entre células, mejorando sus funciones [31].

Para el encapsulado en matrices poliméricas se han usado tanto sustancias relativamente inertes (alginato, agarosa y celulosa) como sustancias extremadamente bioactivas (colágeno y matrigel) [27]. El alginato de calcio es uno de los polímeros más ampliamente utilizado y se ha reportado que los hepatocitos retienen su actividad funcional y su capacidad metabólica luego de la criopreservación en gotas de alginato [70,77].

- **Co-cultivo**

Se sabe que los hepatocitos proveen la mayor parte de las funciones metabólicas y sintéticas, pero también está claro que las células no parenquimatosas tienen gran influencia *in vivo* sobre dichas funciones. Por ello, el co-cultivo resulta una opción interesante para reproducir las condiciones fisiológicas a las que los hepatocitos están sometidos dentro del órgano [27]. Al respecto, algunos autores han demostrado la estabilización de funciones hepato-específicas a través del co-cultivo de hepatocitos con células no parenquimatosas [73].

Como se resaltó en esta sección, la elección del biocomponente adecuado es fundamental en el desarrollo de un modelo de HBA. Sin embargo, el diseño del componente sintético no es de menor importancia, ya que de éste depende que el componente biológico pueda llevar a cabo con éxito sus funciones.

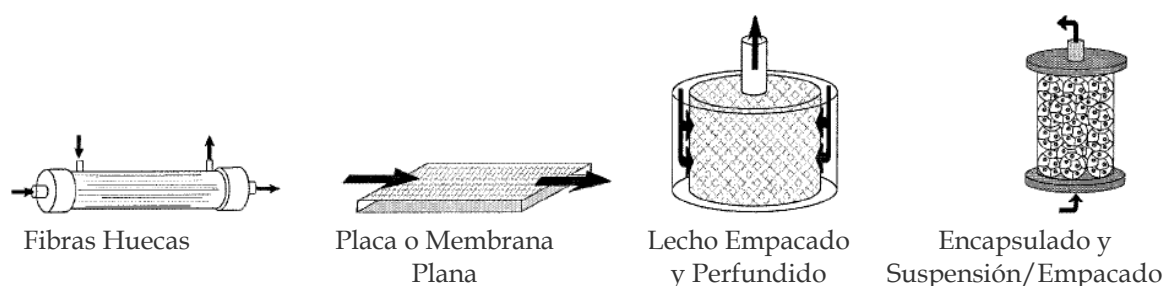
### **1.3.2. COMPONENTE SINTÉTICO O ARTIFICIAL: EL BIORREACTOR**

Como se explicó anteriormente, los HBA son un tipo de terapia de soporte hepático que emplea un componente biológico metabólicamente activo, alojado en un biorreactor, y cuya principal función es la de suplir la mayoría de las funciones que el propio hígado de pacientes con falla hepática no puede llevar a cabo. Para que un HBA pueda realizar estas funciones hepato-específicas con éxito, el

bioreactor debe tener un diseño óptimo para mantener a dicho componente biológico trabajando fisiológicamente por un período prolongado de tiempo. Además, para asegurar que un HBA sea adecuado para aplicaciones clínicas, el funcionamiento del bioreactor debe ser reproducible, fácil de controlar y automatizar y, dentro de lo posible, debe poder adaptarse a las necesidades individuales de cada paciente [72].

### 1.3.2.1. DIFERENTES DISEÑOS DE BIORREACTORES

En la actualidad, los distintos desarrollos de HBA que se están llevando a cabo se basan, principalmente, en una de las cuatro configuraciones de bioreactor que se muestran en la Figura 3.



**Figura 3:** Representación esquemática de los diferentes diseños de bioreactores usados en HBA (adaptado de Allen, J. *et al* [72]).

- **Sistemas de fibras huecas**

Los cartuchos de fibras huecas consisten, básicamente, de una cubierta plástica cilíndrica que contiene varios miles de fibras huecas alineados en su interior. En este tipo de sistemas se distinguen dos compartimientos: el espacio extracapilar (EEC), comprendido entre la pared del cartucho y la parte externa de las fibras, y el espacio intracapilar (EIC), que corresponde al interior de las fibras huecas. Normalmente, el componente biológico es colocado en el EEC, mientras que el lumen de las fibras es perfundido con plasma o sangre. Sin embargo, también se utiliza la estrategia inversa, en la que los hepatocitos son cultivados en el interior de las fibras [70,72,78].

Aunque este tipo de diseño no provee una distribución homogénea del componente biológico, las fibras ofrecen una superficie adecuada para la adhesión celular, proveen inmunoaislamiento y protección contra los daños mecánicos [78]. Las membranas semipermeables con las que están construidas permiten la

transferencia de metabolitos entre el biocomponente y el perfusato. Sin embargo, el componente biológico puede sufrir la escasez de sustratos y nutrientes debido al gran diámetro interno y a la resistencia que su pared ejerce al transporte de solutos [78,79].

La mayoría de los HBA en evaluación clínica se basa en la configuración de fibras huecas (ver Tabla 2), diferenciándose en el tipo de componente biológico que utilizan y en el método elegido para mantenerlo dentro del biorreactor [29,72].

- **Sistemas de placa o membrana plana**

En los sistemas con geometría plana, el componente biológico se adhiere sobre una superficie lisa. La distribución de las células o tejidos es más uniforme y resulta más sencillo controlar la distribución interna del flujo para asegurar una perfusión adecuada de todo el material biológico [72,78]. Permite utilizar el cultivo en sándwich, en el que los hepatocitos mantienen su estructura cuboidal, su polaridad y sus funciones diferenciadas por varias semanas [29].

La principal desventaja de estos biorreactores es la dificultad que implica construir un sistema con la concentración celular suficiente como para llevarlo a una mayor escala para aplicación clínica. Se ha calculado que el volumen muerto de tal sistema podría llegar a ser de 10 L, lo que es totalmente inaceptable para un paciente hemodinámicamente inestable con FHA [72,78].

- **Sistemas de lecho empacado y perfundido**

Esta configuración involucra el relleno de un contenedor con matrices poliméricas que permitan la adhesión del componente biológico y que puedan ser perfundidas con algún medio de cultivo, o con la sangre o plasma del paciente. Varios materiales han sido estudiados para el empacado de hepatocitos, como espumas de poliuretano micro-acanaladas, cubos de polivinilo, cuentas de alginato o de hidroxiapatita porosa, y andamios entretejidos de poliéster [29].

Entre las ventajas que posee esta configuración podemos citar que presenta una mínima barrera al transporte de solutos, promueve una arquitectura tridimensional y puede ser fácilmente escalado. Sus desventajas son la perfusión no uniforme del sistema, el taponamiento y el hecho de que el componente biológico está expuesto a estrés mecánico [72].

El Biorreactor de Flujo Radial (RFB, ver Tabla 2) es el único sistema de HBA en evaluación clínica que usa la configuración de lecho empacado. En este biorreactor, los hepatocitos son atrapados entre microfibras de poliéster entrelazadas y el plasma del paciente es perfundido desde el centro hacia la periferia del lecho empacado, permitiendo el contacto directo de los hepatocitos con el plasma [80].

- **Sistemas de encapsulado y posterior suspensión o empacado**

En estos sistemas, el componente biológico es recubierto por una matriz polimérica para formar pequeñas cápsulas que son luego compactadas dentro de una cámara, o pueden también ser mantenidas en suspensión, para su perfusión [29,72].

Entre sus ventajas destacan el hecho de que todo el componente biológico está expuesto a un micro-ambiente uniforme y la facilidad con la que estos dispositivos pueden ser llevados a mayor escala [72]. A pesar de esto, no hay ningún HBA en evaluación clínica que utilice esta configuración [29].

En nuestro laboratorio, hemos decidido utilizar la tecnología de fibras huecas, debido al amplio conocimiento existente sobre sus características y a la sencillez de su metodología, que permite obtener biorreactores de arquitectura simple y fácil manejo.

### **1.3.2.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS FIBRAS HUECAS**

En la mayoría de los biorreactores de fibras huecas, las fibras deben actuar como barrera de permeabilidad selectiva para el intercambio de gases, la remoción de desechos y el suplemento de nutrientes, y como soporte apropiado para la adhesión y crecimiento celular. Por lo tanto, varios son los factores a tener en cuenta al momento de seleccionar el tipo de membrana a utilizar.

- **Biocompatibilidad de las membranas**

Generalmente, las membranas son elegidas en función de sus propiedades de permeabilidad y separación de componentes. Sin embargo, también debe tenerse en cuenta su cito/histocompatibilidad, ya que las células o tejidos entran en contacto directo con la superficie de las mismas. La respuesta del componente



biológico depende de las propiedades superficiales de las membranas usadas y la introducción de cambios en estas propiedades, como en la rugosidad o en la energía libre superficial, podría mejorar las funciones hepato-específicas [81].

A su vez, la superficie de las membranas entra en contacto directo con la sangre o el plasma del paciente. Por ello, también debe considerarse la hemocompatibilidad del material elegido. Como las membranas utilizadas en la construcción de órganos bioartificiales fueron desarrolladas inicialmente para su uso en hemodiálisis, su composición general y propiedades superficiales han sido optimizadas para minimizar las interacciones con los diferentes componentes humorales y celulares de la sangre como el sistema de coagulación, del complemento y los leucocitos [82].

- **Permeabilidad de las membranas**

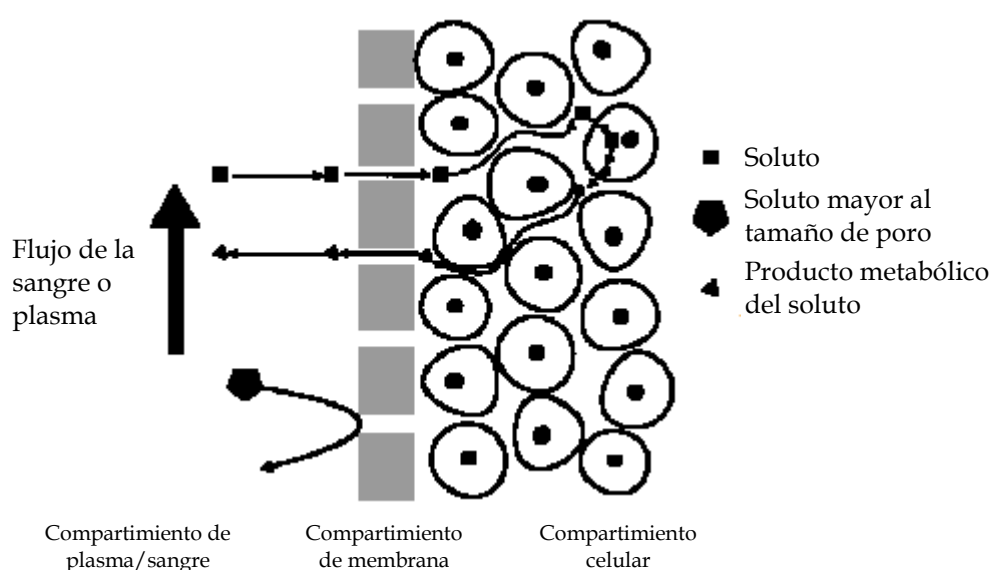
Los fenómenos de transporte son de suma importancia en el desarrollo de un HBA debido a que afectan directamente la viabilidad y funcionalidad del componente biológico y, por lo tanto, el desempeño final del sistema. Así, el oxígeno, los nutrientes y las toxinas presentes en el compartimiento por donde circula la sangre deben ser transportados hacia el compartimiento celular. A su vez, metabolitos específicos y catabolitos, que son producidos en el compartimiento celular, deben ser transportados en la dirección opuesta hacia la sangre. Como protagonistas fundamentales en estos intercambios bidireccionales de masa se encuentran las membranas utilizadas en la construcción del biorreactor.

Si consideramos el transporte de una sustancia dada desde la sangre al compartimiento en el que se encuentra el componente biológico, debemos tener en cuenta los siguientes procesos (Figura 4) [70]:

- 1) Migración desde el seno del compartimiento sanguíneo hasta la interfaz sangre-membrana, que ocurre por un mecanismo de difusión-convección.
- 2) Pasaje a través de las membranas semipermeables, mediante difusión y/o convección, en respuesta a los gradientes de concentración o presión transmembrana existentes. La porosidad y la superficie de las fibras huecas, así como el grosor de la membrana, influyen sobre esta

transferencia. Si se incrementa el tamaño de poro se incrementa de forma concomitante la transferencia de solutos tanto por difusión como por convección, pero también se ve facilitado el transporte de proteínas inmunogénicas. Por ello, la porosidad de la membrana es una característica importante ya que determina el tamaño de los solutos permeables.

- 3) Migración desde la superficie de las membranas a través de la masa celular, la cual está limitada por la presencia del componente biológico en el compartimiento correspondiente.



**Figura 4:** Fenómenos involucrados en el transporte de masa dentro de biorreactores de fibras huecas (modificado de Planchamp et al. [70]).

Por lo expuesto anteriormente, puede deducirse que dos de los parámetros que condicionan la permeabilidad de las membranas son el tamaño de poro y el espesor de su pared. Este último tiene influencia, fundamentalmente, sobre la velocidad de los procesos de transporte, mientras que el tamaño de poro determina si el soluto podrá atravesar la membrana o no (Figura 4). Las características fisicoquímicas de la membrana también inciden sobre su permeabilidad, al permitir el pasaje de solutos con propiedades similares, debido al establecimiento de interacciones membrana-soluto durante el proceso [81].

Para cada membrana, el tamaño de poro es caracterizado por su “valor de corte de peso molecular” (del inglés: molecular weight cutoff, MWCO), que fija el límite de tamaño de los solutos que pueden atravesar dicha membrana. En el

diseño de un HBA, este parámetro es seleccionado de manera de prevenir la exposición del componente biológico a componentes del sistema inmune y para bloquear el transporte de sustancias xenogénicas de gran tamaño hacia la circulación. Con el propósito de permitir el libre pasaje de proteínas transportadoras, como la albúmina (~60 kDa), e impedir el paso de las inmunoglobulinas (~150 kDa), componentes del sistema del complemento (>200 kDa) o virus, en la mayoría de los desarrollos se han seleccionado membranas con valores de corte entre 100 y 150 kDa [72].

- **Componentes estructurales de las fibras huecas**

Tanto la biocompatibilidad como la permeabilidad de las fibras huecas son determinadas, en gran medida, por el material con el que las mismas están hechas. Por ello, en el desarrollo de un biorreactor, resulta importante conocer las características de dichos materiales para seleccionar el más adecuado a nuestros fines.

La tecnología de las fibras huecas comenzó a desarrollarse para su uso en cartuchos de diálisis y, luego, fue adoptada para la construcción de biorreactores. Los materiales utilizados en la producción de estas fibras pueden clasificarse dentro de las categorías que se detallan a continuación [83]:

*Celulosas regeneradas, celobiosas o hemicelulosas:* se caracterizan por ser estructuras sumamente hidrofílicas y de aspecto homogéneo, que absorben agua para formar un verdadero hidrogel a través del que difunden los solutos. Permiten la obtención de membranas muy finas y, sin embargo, suficientemente resistentes. Su prototipo es el Cuprophane®.

*Celulosas modificadas:* mediante sustitución de las funciones alcoholílicas de la glucosa se modifican las propiedades superficiales de las membranas de celulosa regenerada. La difusión de solutos sigue ocurriendo a través de un hidrogel. La sustitución puede practicarse con diversos radicales, tales como ácido benzoico o dietil aminoetanol, como en el caso de Hemophane®, aunque la sustitución más frecuente es la acetilación. Cada monómero de glucosa ofrece tres grupos hidroxilo susceptibles de acetilación, lo que permite la obtención de tres derivados: monoacetato, diacetato y triacetato de celulosa.

*Polímeros sintéticos:* Este grupo engloba una amplia variedad de membranas, de muy diferente composición, con la característica común de ser de origen sintético. Son de estructura sólida, con espacios vacíos y poseen un alto grado de hidrofobia. La matriz de la membrana la constituye una región esponjosa, con intersticios de tamaño variable, que le confiere resistencia mecánica. Ambas caras de esta matriz están recubiertas por películas porosas que constituyen la barrera selectiva que determina el pasaje o retención de solutos. En conjunto, son denominadas membranas sintéticas de alto flujo o de alta permeabilidad, ya que son más permeables que las pertenecientes a los otros grupos. Dentro de los polímeros sintéticos utilizados podemos mencionar: polisulfona, poliamida, polimetilmetacrilato, polietilénpolivinilalcohol, entre otros.

En este punto cabe aclarar que, para optimizar el uso de las fibras huecas en la construcción de órganos bioartificiales, se están buscando nuevos polímeros sintéticos que sean compatibles tanto con el componente celular como con los componentes de la sangre [82,84].

### **1.3.2.3. EL PROBLEMA DE LA OXIGENACIÓN**

Uno de los desafíos más importantes en el desarrollo de un sistema exitoso de HBA es conseguir una adecuada oxigenación del componente biológico alojado dentro del biorreactor. En el hígado, el oxígeno es provisto por una mezcla de sangre altamente oxigenada, transportada por la arteria hepática, con sangre rica en nutrientes, pero pobre en oxígeno, de la vena porta. Esta mezcla se produce en los sinusoides, justo antes de irrigar a los hepatocitos, por lo que estos nunca quedan expuestos a sangre oxigenada por completo. A su vez, las tensiones de oxígeno varían entre diferentes regiones del órgano: los hepatocitos que se encuentran alrededor de los espacios porta están expuestos a mayores presiones de oxígeno en sangre (60-70 mmHg) que las células ubicadas alrededor de las venas centrales (25-35 mmHg) (ver Figura 1). Por otro lado, más allá de los niveles de oxígeno existentes, la arquitectura del órgano permite su máximo aprovechamiento: los sinusoides hepáticos están dispuestos de manera tal que las distancias a través de las que debe difundir el oxígeno para llegar a las células son

mínimas [31,85]. Por todo ello, resulta dificultoso reproducir en un biorreactor las condiciones de oxigenación existentes *in vivo*.

El oxígeno es esencial para la supervivencia de los hepatocitos y su concentración afecta la viabilidad y funcionalidad de este tipo celular. Condiciones de anoxia (0 mmHg O<sub>2</sub>) limitan severamente la continuidad de las vías metabólicas, comprometen la integridad de la membrana plasmática y, eventualmente, llevan a la muerte celular por necrosis. Las bajas tensiones de oxígeno (5–15 mmHg O<sub>2</sub>) también generan respuestas celulares caracterizadas por cambios hacia procesos metabólicos más anaeróbicos o por la expresión de factores que incrementan la provisión de oxígeno. Por otro lado, un exceso de este metabolito puede resultar tóxico. Un ambiente de hiperoxia (>160 mmHg O<sub>2</sub>) lleva a la formación de especies reactivas del oxígeno, las cuáles están implicadas en la injuria celular mediante peroxidación lipídica y expresión de citoquinas [86]. Esto indica que las concentraciones de oxígeno dentro del compartimiento biológico de un HBA deben ser mantenidas dentro de rangos estrechos para evitar efectos nocivos.

Se considera que la tensión de oxígeno óptima para el mantenimiento de células y tejidos hepáticos dentro de un biorreactor es aquella que más se aproxime a la situación *in vivo*, donde los niveles fisiológicos en la superficie celular se encuentran entre 20 y 65 mmHg [29]. Las dificultades fundamentales para conseguir este óptimo nivel de oxigenación dentro de un biorreactor se deben a la baja solubilidad y al bajo coeficiente de difusión del oxígeno en soluciones acuosas, lo que se ve agravado por la elevada tasa de consumo de este gas por parte de los hepatocitos y por las altas densidades celulares requeridas en un HBA [81,87].

Se han utilizado numerosas estrategias para superar los problemas de oxigenación dentro de los biorreactores hepáticos. El sistema desarrollado por Gerlach y col. contiene un haz de fibras huecas hidrofóbicas dedicado exclusivamente a la oxigenación del componente biológico, así como el desarrollado por Chamuleau y col. [29]. El uso de configuraciones tipo lecho empacado y perfundido también ha demostrado mejores resultados en cuanto a

transferencia de oxígeno, comparado con los reactores de fibras huecas [80]. También se ha ensayado la aplicación de transportadores de oxígeno basados en hemoglobina [88] y el suplemento del medio de cultivo con sustancias inertes que mejoran la disolución de este gas [85]. La mayoría de los modelos en evaluación clínica cuenta con sistemas de oxigenación externos al biorreactor (ver Tabla 2), aunque otra posibilidad es utilizar sistemas internos. En nuestro caso, hemos incorporado un tubo oxigenador interno de silicona, que provee de oxígeno directamente al compartimiento biológico.

Dado que el oxígeno juega un rol clave en la viabilidad y funcionalidad de las células hepáticas, un inadecuado nivel de oxigenación puede condicionar el éxito de un HBA. Por ello, durante el desarrollo de esta tesis, se estudiaron exhaustivamente las vías de provisión de oxígeno, la velocidad de consumo de este metabolito por parte del componente biológico y los niveles de dicho gas dentro del biorreactor, con el fin de determinar la adecuación entre el suministro y las demandas metabólicas celulares.

### **1.3.3. VALIDACIÓN DEL PROTOTIPO DISEÑADO**

Una vez seleccionado el componente biológico y diseñado el modelo de biorreactor a escala de laboratorio, el sistema debe validarse. Este proceso consiste en chequear su habilidad para sostener una buena viabilidad y funcionalidad del componente biológico. La validación constituye un paso importante, ya que el adecuado desempeño de un HBA depende directamente de estos factores. Entre las pruebas que pueden realizarse, podemos citar [70]:

- Evaluación del consumo de oxígeno y síntesis de compuestos endógenos: El consumo de oxígeno es utilizado para determinar la viabilidad celular ya que muestra el estado bioquímico de la población celular. La determinación de la función y de la expresión de genes que codifican proteínas específicas, como albúmina o enzimas del ciclo de la urea, refleja la capacidad de biosíntesis de los hepatocitos asociada a la preservación de su actividad transcripcional. Las medidas de liberación de enzimas intracelulares como LDH, actúan como criterio de integridad celular.

- Estudio del metabolismo de drogas y compuestos endógenos: La eliminación de  $\text{NH}_4^+$  es una reacción metabólica relevante para determinar el buen funcionamiento del HBA debido a que la acumulación de este compuesto está relacionada con el desarrollo de encefalopatía hepática. Además, dada la importancia del hígado en la excreción de sustancias exógenas, existe una gran cantidad de drogas que pueden utilizarse para evaluar la capacidad metabólica del componente celular, como diazepam, lidocaína, ciclosporina, entre otras.

Una vez superada la etapa de validación, el prototipo diseñado ya está listo para ser utilizado como una herramienta de laboratorio para el estudio de diferentes procesos que ocurren a nivel del hígado, como se verá a continuación. En cambio, en el caso de formar parte de un sistema de hígado bioartificial, el camino continúa y el prototipo debe ser sometido a los procesos de escalado y evaluación, tanto en modelos animales como en pacientes. Estas etapas finales se describirán en las dos últimas secciones de esta introducción.

#### **1.3.4. APLICACIONES ALTERNATIVAS DE UN BIORREACTOR HEPÁTICO**

El objetivo final de la mayoría de los grupos que desarrollan un biorreactor hepático es su uso como HBA. Sin embargo, contar con un biorreactor que permita mantener en condiciones óptimas cualquier componente biológico de origen hepático puede a su vez tener otras aplicaciones interesantes:

- Estudio del metabolismo y transporte de drogas: el biorreactor constituye un modelo alternativo a los cultivos en placa o en suspensión [70].
- Evaluación de los efectos de diferentes protocolos de preservación: el biorreactor puede utilizarse como herramienta de laboratorio que mimetice las condiciones de readaptación fisiológica post-preservación, para estudiar la eficacia de nuevos métodos de preservación y los efectos de la hipotermia sobre la viabilidad y funcionalidad celular.
- Detección de drogas y toxicología: el uso de biorreactores que alojen hepatocitos primarios o microórganos hepáticos humanos resulta una opción

atractiva para el estudio de la toxicidad o carcinogenicidad de ciertos productos químicos ya que evitaría el empleo de animales [81].

- Síntesis de productos celulares: para ello, las líneas celulares derivadas de tumores constituyen el componente biológico ideal ya que presentan una secreción continua del metabolito de interés, siendo más fácil su purificación y mayor su rendimiento [70]. Para que este proceso sea aplicable a escala industrial, el biorreactor debe someterse a un proceso de escalado, al igual que un HBA.

### **1.3.5. ESCALADO Y EVALUACIÓN EN MODELOS ANIMALES**

Para que un dispositivo pueda ser utilizado en la clínica, debe ser escalado a un tamaño adecuado para el efectivo tratamiento de pacientes con falla hepática. Para sostener con vida a una persona sería necesario de un 10 a un 30 % de la masa hepática normal. En un adulto, esta cantidad equivale a una masa celular entre 150 y 450 gramos, es decir, son necesarios como mínimo  $1,5 \times 10^{10}$  hepatocitos. Los dispositivos en evaluación clínica utilizan entre  $1$  y  $2 \times 10^{10}$  hepatocitos [29,72].

Durante el proceso de escalado, la evaluación del biorreactor puede realizarse *in vitro* y en diferentes modelos animales de falla hepática. Se han desarrollado modelos en animales pequeños, como rata y conejo, y en animales de mayor tamaño, como cerdo y perro. El uso en estos modelos permite determinar si los dispositivos son seguros, técnicamente aplicables y si provocan algún efecto terapéutico [89,90].

El desarrollo de un sistema de HBA también implica la incorporación del biorreactor dentro de un sistema circulatorio extracorporal adecuado. En este pueden añadirse filtros para evitar el escape del componente biológico hacia la circulación, sistemas separadores de plasma y dispositivos anexos que colaboren en la función del biorreactor como columnas de carbón activado. El adecuado funcionamiento del conjunto de dispositivos es monitoreado por computadoras que controlan y regulan el pH, la temperatura, la presión de los filtros, el flujo y la concentración de oxígeno y de nutrientes en el medio celular, entre otros parámetros [72,91].



Una vez superadas todas las etapas de desarrollo y estudios pre-clínicos (ensayos *in vitro* y en modelos animales), el prototipo diseñado se encuentra en condiciones de ser evaluado en humanos.

### **1.3.6. MODELOS DE HBA EN EVALUACIÓN CLÍNICA**

En 1987, Matsumura y col. [92] reportaron la primera aplicación clínica de un hígado bioartificial en un paciente con falla hepática que fue sometido a dos tratamientos consecutivos, a los que sobrevivió sin señales de efectos adversos.

Los resultados de este trabajo alentaron el ensayo clínico de otros sistemas con el fin de obtener información sobre el funcionamiento de los mismos, determinar si su uso tiene realmente efectos positivos sobre el estado clínico y la supervivencia de los pacientes, y evaluar sus posibles riesgos y complicaciones. Estos ensayos clínicos aportan conocimientos necesarios para optimizar el diseño de un HBA y constituyen el paso previo necesario a la comercialización de cualquier dispositivo de uso médico. En la Tabla 2, se resumen las características de los principales prototipos que actualmente se encuentran en evaluación clínica.

Existe una amplia diversidad de modelos de soportes híbridos desarrollados y evaluados por distintos grupos de investigación en todo el mundo. Sin embargo, a pesar de los numerosos prototipos diseñados y de varias décadas de investigación en el área, todavía no se ha alcanzado el éxito esperado para este tipo de tecnologías, por lo que el campo de los hígados bioartificiales continúa abierto a nuevos desarrollos.

**TABLA 2:** Características generales de los principales sistemas de HBA bajo ensayo clínico (adaptado de Wang *et al.* [29])

Dispositivo	Configuración del Biorreactor	Tipo, cantidad y forma de cultivo celular	Tiempo de tratamiento	Perfusato	Flujo (mL/min)	Fuente de O <sub>2</sub>
<b>HepatAssist (Demetriou y col.) [93]</b>	Fibras huecas, polisulfona, poro de 0,15 a 0,2 µm	Hepatocitos de cerdo criopreservados, (5-7) x 10 <sup>9</sup> , agregados unidos a microcarriers	45-89 h (6 horas por sesión)	Plasma	400	Pre-biorreactor
<b>ELAD (Sussman y col.) [94]</b>	Fibras huecas, acetato de celulosa, corte 120 kDa	Línea celular C3A, 400 g, formando agregados unidos a las fibras	Hasta 168 h	Sangre	500	Pre-biorreactor
<b>BLSS (Mazariegos y col.) [95]</b>	Fibras huecas, acetato de celulosa, corte 100 kDa	Hepatocitos de cerdo recién aislados, 100 g, atrapados en gel de colágeno	12 h	Sangre	100-250	Pre-biorreactor
<b>AMC (Chamuleau y col.) [96]</b>	Matriz de poliéster arrollada en espiral	Hepatocitos de cerdo recién aislados, 12 x 10 <sup>9</sup> , agregados unidos a una matriz polimérica	Hasta 24 h	Plasma	150	Mediante capilares dentro del biorreactor
<b>MELS (Gerlach y col.) [97]</b>	Fibras huecas, múltiples haces	Hepatocitos humanos/de cerdo recién aislados, 600 g, formando estructuras tipo tejido	7-74 h	Plasma	100-200	Mediante capilares dentro del biorreactor
<b>RFB (Morsiani y col.) [80]</b>	Lecho empacado	Hepatocitos de cerdo recién aislados, 200 g, agregados atrapados en microfibras	Hasta 24 h	Plasma	200-300	Pre-biorreactor

Abreviaturas: ELAD: Extracorporeal Liver Assist Device; BLSS: Bioartificial Liver Support System; AMC-BAL: Academic Medical Center – BioArtificial Liver; MELS: Modular Extracorporeal Liver Support; RFB: Radial Flow Bioreactor.

## 2. OBJETIVOS

### **2.1. OBJETIVO GENERAL:**

Desarrollar un prototipo de biorreactor que pueda ser utilizado como dispositivo de asistencia extracorporal para soporte de la función hepática, principalmente, en casos de falla hepática aguda.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

*En lo que respecta al estudio del componente biológico, su obtención y preservación:*

- Perfeccionar las técnicas de obtención de microórganos hepáticos (MOHs) a partir de hígados de rata.
- Evaluar y optimizar los métodos de preservación hipotérmica de MOHs, prestando especial interés a los parámetros funcionales de detoxificación de amonio y síntesis de urea.
- Evaluar el posible rol protector del compuesto dador de monóxido de carbono, CORM-3, durante la preservación hipotérmica de MOHs de rata, analizando parámetros de viabilidad y funcionalidad del tejido durante el período de reoxigenación normotérmica.

*En lo que respecta al desarrollo y optimización del componente artificial:*

- Caracterizar las variables de operación de los sistemas diseñados, y las propiedades de permeabilidad y ultrafiltración de las fibras utilizadas en la construcción de los mismos.
- Establecer el grado de hemólisis generado por el sistema durante los 120 minutos de perfusión, teniendo en cuenta que el fin último es el uso en pacientes.
- Estudiar la provisión de oxígeno en el minibiorreactor y determinar su adecuación a los requerimientos metabólicos del componente biológico.

*Con respecto a la validación in vitro de los MBR diseñados:*

- Evaluar la adecuación de los MBR diseñados para el uso de MOHs de rata, frescos y preservados, como componente biológico alternativo a las suspensiones de hepatocitos.
- Analizar comparativamente el desempeño de MOHs y de suspensiones de hepatocitos como componente biológico en nuestros prototipos de HBA.

# 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### **3.1. ESTUDIOS SOBRE EL COMPONENTE BIOLÓGICO, SU OBTENCIÓN Y PRESERVACIÓN**

Para poder desarrollar un hígado bioartificial, es necesario contar con un componente biológico que pueda suplir las funciones del órgano dañado. Además, resulta de vital importancia tener acceso al mismo en el momento y lugar en el que sea necesario para el tratamiento de pacientes. Por ello, el desarrollo de estrategias de preservación de dicho componente biológico constituye un paso esencial en el diseño de un HBA.

#### **3.1.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas, con un peso que osciló entre los 300 y 380 gramos. Los animales fueron mantenidos con alimento balanceado estándar y agua *ad-libitum*, y sometidos a períodos de luz de 06:00 a 18:00 h hasta el momento de su utilización. Los animales fueron provistos por el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, y tratados respetando las normas nacionales e internacionales de manipulación de animales de laboratorio.

Los experimentos se realizaron utilizando protocolos aprobados por la Comisión de Bioética para el Manejo de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, en concordancia con reglamentaciones internacionales.

#### **3.1.2. ESTUDIOS SOBRE LA PRESERVACIÓN HIPOTÉRMICA DE MICROÓRGANOS HEPÁTICOS**

Como ya se enunció, el componente biológico “ideal” para ser aplicado en un HBA debe ser aquel que tenga en su composición todos los tipos de células hepáticas. Por ello, durante este trabajo de tesis, se evaluó el uso de microórganos hepáticos (MOHs), que consisten en finos cortes de hígado que mantienen la estructura del tejido hepático, y se ahondó en el desarrollo de un método de obtención y preservación adecuado para los mismos con el fin de garantizar su disponibilidad para la utilización en nuestro HBA.

Para evaluar la eficacia del método de preservación desarrollado se utilizó, en primera instancia, un sistema de reoxigenación normotérmica (SRN) más sencillo que el HBA (ver Figura 6). En esta etapa se estudiaron, de manera simple y rápida, diferentes parámetros funcionales que los MOHs deben conservar para poder desempeñarse como un biocomponente eficaz.

### 3.1.2.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL GENERAL

En la Figura 5 se esquematizan los estudios realizados con MOHs de rata en el sistema de reoxigenación normotérmica (SRN).

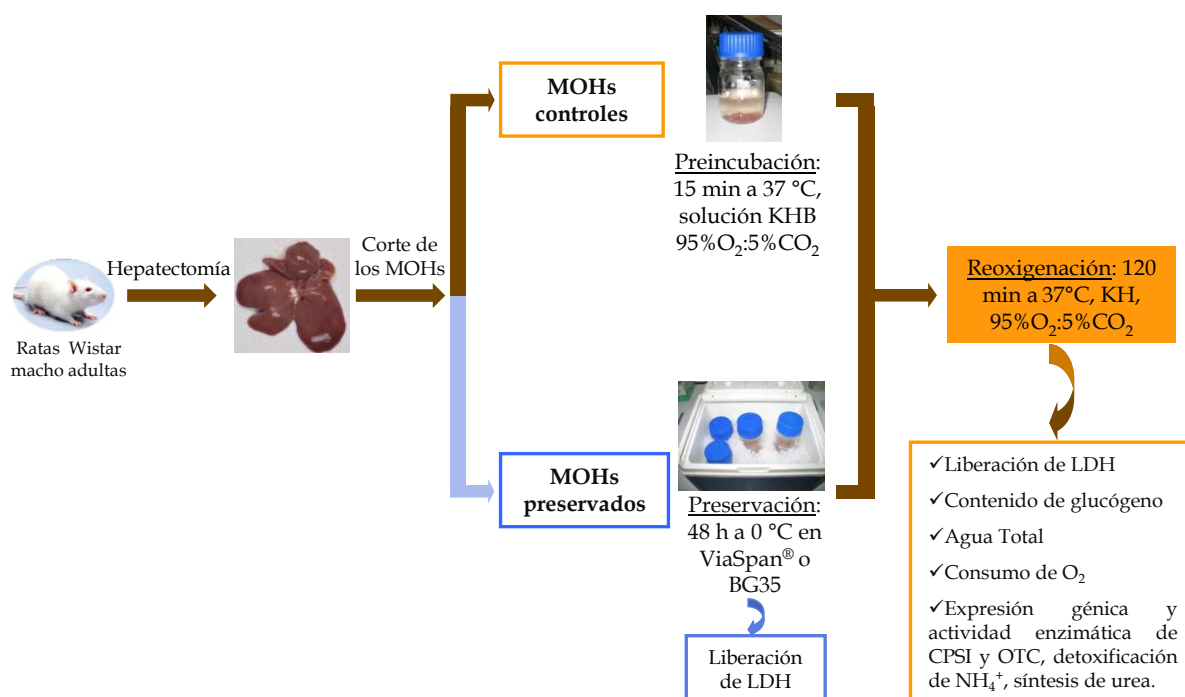


Figura 5: Esquema general de los procesos de obtención y preservación de MOHs de rata, y de los ensayos realizados en el SRN.

En una primera etapa, se trabajó con los 3 grupos experimentales que se detallan a continuación:

- *Grupo control*: luego de su obtención, los MOHs fueron sometidos a una etapa de preincubación (15 minutos en solución KHB a 37 °C, bajo atmósfera de carbógeno), para obtener una población más homogénea y favorecer así la reproducibilidad en el muestreo posterior. Finalmente, fueron sometidos al SRN (n = 3).

- *Grupo ViaSpan®*, en el que los MOHs fueron almacenados a 0 °C por 48 h en solución UW comercial (Gold Standard) y luego estudiados en el SRN (n = 3).



- *Grupo BG35*, en el que los MOHs fueron preservados a 0 °C por 48 h en BG35, solución desarrollada en nuestro laboratorio, y luego evaluados en el SRN (n = 3).

La composición de las soluciones de preservación se detalla en la Tabla 3.

### **3.1.2.2. OBTENCIÓN Y PRESERVACIÓN DE MICROÓRGANOS HEPÁTICOS (MOHs) DE RATA**

#### **3.1.2.2.1. Hepatectomía**

Los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de una solución de hidrato de cloral al 8 % en agua (0,5 mL cada 100 g de peso corporal). Luego de anestesiado, el animal fue fijado mediante tiras adhesivas a una tabla de cirugía. Para evitar la formación de trombos se le administró una dosis de 200 unidades de heparina sódica (1000 U/mL) por vía intravenosa. Para ello, se realizó una disección de la región antero-interna del muslo y se inyectó la heparina en la vena femoral, inmediatamente antes de la cirugía.

Se realizó una incisión abdominal en forma de T invertida, desplazando los intestinos hacia el lado izquierdo del animal y dejando visible los grandes vasos abdominales. Se pasaron dos ligaduras alrededor de la vena porta y se introdujo un catéter 16G (Abbocath-T, Abbott Ireland Ltd.) en la misma. Inmediatamente, se anudaron las ligaduras y el hígado fue lavado con 20 mL de solución Krebs-Henseleit Base (KHB, cuya composición se detalla en la Tabla 4), en el caso de los controles, o con la solución de preservación correspondiente (Tabla 3). Al mismo tiempo, se cortó la vena cava inferior a nivel abdominal, por debajo de las venas renales, con el fin de eliminar la sangre y el líquido de lavado y evitar el aumento de la presión intrahepática. Finalmente, el animal fue sacrificado por corte del diafragma y el hígado fue extirpado cuidadosamente. El órgano fue lavado externamente con solución KHB fría, para eliminar restos de sangre, y fue conservado en un vaso de precipitado con 50 mL de la misma solución a 0 °C.

#### **3.1.2.2.2. Corte de los MOHs**

El hígado se separó en sus lóbulos y cada lóbulo se cortó en cuatro bloques de aproximadamente el mismo tamaño. Tanto los lóbulos como los bloques de

hígado se procesaron de a uno por vez y se conservaron en solución KHB fría hasta el momento de ser usados.

Los MOHs fueron obtenidos manualmente, cortando los bloques de hígado en finas laminas de aproximadamente 300 a 400  $\mu\text{m}$  de espesor. Los cortes fueron realizados usando una cuchilla de micrótopo acoplada a un asa de plástico (diseñada en nuestro laboratorio) para facilitar su manipulación. Se trabajó a 0 °C (en hielo) para disminuir el deterioro del tejido y sobre papel de filtro para evitar el deslizamiento de los bloques que pudiera impedir el corte preciso de las láminas.

A medida que fueron cortados, los MOHs controles se colocaron en solución Krebs-Henseleit Base (KHB), mientras que los MOHs que fueron sometidos al proceso de preservación se colocaron en las diferentes soluciones de preservación.

Cabe aclarar que, una vez finalizada la etapa de corte, se determinó el espesor de los MOHs utilizando un calibre DIGIMESS® (Pocket Thickness Gage, 0,1 mm-10 mm). Los cortes se colocaron entre 2 cubreobjetos y se midió el espesor, a dicho valor se le resto el espesor de los 2 cubreobjetos medidos previamente.

### 3.1.2.2.3. Soluciones de preservación utilizadas

Las soluciones de preservación empleadas en el estudio con MOHs de rata fueron: la solución ViaSpan®, nombre comercial de la solución UW, y la solución BG35 desarrollada en nuestro laboratorio. La composición de dichas soluciones se detalla en la Tabla 3.

**TABLA 3:** Composición de las soluciones de preservación empleadas

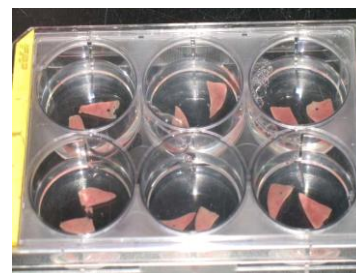
Componentes	Solución ViaSpan®	Solución BG35
Ácido Lactobiónico	100 mM	-
Gluconato de K	-	100 mM
Rafinosa	30 mM	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25 mM	2,5 mM
PEG 35000	-	4 %
BES	-	50 mM
MgSO <sub>4</sub>	5 mM	5 mM
Insulina	40 U/L*	-
Alopurinol	1 mM	-
Almidón hidroxietilado	50 g/L	-
Glicina	-	15 mM
Adenosina	5 mM	5 mM*
Glutation	3 mM	3 mM*

Estreptomicina	-	0,25 mg/mL
Penicilina G	10 UI/mL*	10 UI/mL
Dexametasona	10 µg/mL*	-
pH	7,40	7,40
mOsm/Kg de H <sub>2</sub> O	316 ± 5 (n=10)	327 ± 4 (n=10)
Los componentes marcados con * se agregan a la solución inmediatamente antes de su utilización; la solución BG35 se burbujea con N <sub>2</sub> durante 15 min previo a su uso. BES: ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico.		

### 3.1.2.3. REOXIGENACIÓN DE MOHs CONTROLES Y PRESERVADOS

#### 3.1.2.3.1. Sistema de reoxigenación normotérmica

El grupo control, luego del período de preincubación, y los grupos preservados, luego de las 48 h de almacenamiento en frío, fueron evaluados en un sistema *in vitro* de reoxigenación normotérmica. En este sistema, los MOHs fueron colocados en placas de cultivo de 6 pocillos y mantenidos en solución KHA a 37 °C, en un baño tipo Dubnoff, con agitación lateral y bajo atmósfera de carbógeno (95 % O<sub>2</sub>: 5 % CO<sub>2</sub>), durante 120 minutos. En la Figura 6 puede apreciarse la disposición adoptada: en cada pocillo fueron colocados 2 MOHs en 5 mL de solución KHA; durante la reoxigenación se tomaron muestras a los tiempos 0, 60 y 120 minutos para evaluar la viabilidad y funcionalidad de los MOHs.



**Figura 6:** Disposición de los MOHs en el SRN.

#### 3.1.2.3.2. Composición de las soluciones KH utilizadas

La composición de las diferentes soluciones KH se detalla en la Tabla 4. La solución KH-Base (KHB) fue utilizada en el proceso de obtención y corte de los MOHs, y en el período de preincubación del grupo control. La solución KH-Amonio (KHA) fue utilizada durante la reoxigenación normotérmica; a la misma se le agregó una sobrecarga de amonio con el fin de obtener una concentración final de este compuesto de 1 mM.

**TABLA 4:** Composición de las diferentes soluciones KH utilizadas

Componentes	Solución KHB	Solución KHA
NaCl	114 mM	114 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM	1,2 mM

KCl	4,8 mM	4,8 mM
MgSO <sub>4</sub>	1,2 mM	1,2 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,5 mM	1,5 mM
HEPES	10 mM	10 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM	25 mM
Glucosa	25 mM	25 mM
Alopurinol	1 mM	1 mM
Fructosa	5 mM	5 mM
Glicina	-	3 mM
Adenosina	-	10 µM
Ornitina	-	6 mM
Lactato de sodio	-	10 mM
pH	7,40	7,40
mOsm/kg de H <sub>2</sub> O	293 ± 6 (n=10)	328 ± 5 (n=10)

#### 3.1.2.4. ENSAYOS DE VIABILIDAD

Las pruebas de viabilidad son usadas para evaluar el grado de deterioro que sufre el tejido cuando es sometido a una situación de estrés. El ensayo ideal para evaluar la viabilidad debe:

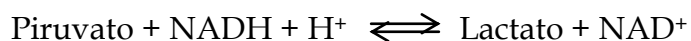
- reflejar una función vital de la célula.
- ser lo suficientemente sensible para poder detectar alteraciones en alguna función.
- ser rápido y sencillo de realizar.
- poder utilizarse en una amplia variedad de circunstancias.

Sin embargo, como lo ha expresado el grupo de Krebs y colaboradores, en el caso del hígado no existe una prueba que por sí sola brinde toda la información sobre la competencia metabólica de los hepatocitos [98]. Por lo tanto, debe utilizarse una combinación de criterios que brinden información acerca de la integridad de la membrana, del correcto funcionamiento y del rendimiento metabólico de la célula o del tejido, en general.

##### 3.1.2.4.1. Ensayo de liberación de LDH

La liberación de enzimas citosólicas solubles al medio de preservación, perfusión o incubación, como la Lactato Deshidrogenasa (LDH), constituye una expresión del daño estructural en la membrana [99].

Para la cuantificación de la LDH se tiene en cuenta que la misma cataliza la siguiente reacción reversible:



En las condiciones de trabajo, la reacción está desplazada hacia la producción de lactato y la velocidad de oxidación del NADH, determinada a 340 nm, es proporcional a la actividad de LDH en la muestra.

El ensayo consiste en incubar 50  $\mu$ L de muestra en 1,525 mL de medio conteniendo 0,6 mM piruvato, 0,2 mM NADH en buffer fosfato de potasio 50 mM, pH = 7,50, en una cubeta termostatizada a 37 °C. Se lee la absorbancia a 340 nm durante 3 minutos y se determina el cambio de absorbancia por minuto ( $\Delta$ Abs/min), que, en valor absoluto, no debe ser mayor de 0,060 unidades para evitar una subestimación de la enzima.

Los resultados se expresaron como porcentaje de liberación de LDH a los diferentes tiempos. Dicho porcentaje se calculó comparando la actividad enzimática en la solución en la que se encuentran los MOHs a cada tiempo con la actividad total (actividad de la enzima en el homogenado de MOHs + actividad en la solución luego de los 120 minutos). Un alto porcentaje de liberación indica la incapacidad de la célula para retener la enzima citosólica.

#### **3.1.2.4.2. Determinación del contenido de glucógeno**

En este ensayo, se evalúa la viabilidad al examinar el contenido de un metabolito necesario para el funcionamiento celular, como lo es el glucógeno. Existen trabajos en los que se ha demostrado la importancia de la determinación del contenido de glucógeno como marcador de la competencia metabólica y se ha sugerido que el mismo representa un indicador más sensible que el contenido de ATP o GSH [100].

El contenido hepático de glucógeno se determinó empleando la técnica descrita por Carr y Neff [101], en la cual se utiliza la enzima amiloglucosidasa para liberar glucosa a partir de glucógeno. Dicha enzima hidroliza específicamente los enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 del polisacárido, liberando de esta manera glucosa, la que puede ser cuantificada mediante el empleo de un espectrofotómetro a 505 nm.

Para la determinación del contenido de glucógeno se homogenizaron 2 MOHs en 2 mL de buffer citrato de sodio 100 mM (pH=5,00) con un homogenizador ULTRA-TURRAX (T25 Basic, IKA® WORKS, INC). El homogenado fue dividido en dos alícuotas de 1 mL cada una, que fueron

inactivadas mediante su incubación en un baño (Mettmert WB/OB 7-45) a 100 °C durante 4 min. Posteriormente, las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiente. A una de las alícuotas ( $H_E$ ) se le agregaron 25  $\mu$ L de amiloglucosidasa preparada al 0,5 % en citrato de sodio 100 mM, pH = 5,00; mientras que a la otra ( $H$ ) se le incorporaron 25  $\mu$ L de agua destilada. Ambas alícuotas fueron incubadas a 55 °C en un baño termostatzado (Lab-line/Dubnoff Incu-shaker bath Modelo 3676), con agitación ocasional, durante 2 h. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas y en los sobrenadantes obtenidos se dosó el contenido de glucosa por el método enzimático (Trinder), utilizando un kit comercial (Glicemia enzimática AA, Wiener Lab, Rosario, Argentina).

Como este ensayo dosa glucosa, se construyó una curva de calibración para dicho compuesto utilizando un estándar de concentración 1 mg/mL. Los valores de absorbancia obtenidos para las diferentes muestras se extrapolaron en la curva para obtener la concentración de glucosa. Además, a partir de los valores de absorbancia de los distintos puntos de la curva de calibración de glucosa se obtuvo un factor promedio en  $\mu$ g de Glucosa/UAbs.

De la diferencia entre la cantidad de glucosa determinada en  $H_E$  (glucosa total = glucosa libre + glucosa como glucógeno) y en  $H$  (glucosa libre), se obtiene la concentración de glucosa proveniente de la hidrólisis del glucógeno almacenado en las células hepáticas.

Por otro lado, se realizó una curva de calibración para glucógeno usando un testigo de concentración 1 mg/mL. El testigo de glucógeno recibió el mismo tratamiento que las muestras. A partir de los valores de absorbancia de los distintos puntos de la curva se obtuvo otro factor promedio, expresado en  $\mu$ g de Glucógeno/UAbs. Utilizando ambos factores se obtuvo una relación que permitió expresar los valores en mg de glucógeno/g tejido.

### **3.1.2.5. ESTUDIOS FUNCIONALES**

En este tipo de ensayo se evalúa la capacidad de la célula o tejido para llevar a cabo funciones específicas en el período de reoxigenación normotérmica, ya que durante la preservación hipotérmica se produce una pérdida de componentes

metabólicos esenciales que puede limitar la capacidad de las células para recuperar su función durante la reoxigenación.

### 3.1.2.5.1. Determinación del consumo de oxígeno

La determinación de la actividad respiratoria es un test metabólico específico para evaluar la funcionalidad del tejido, ya que una disminución en la respiración mitocondrial lleva a la depleción de ATP y al consecuente daño en las vías metabólicas y procesos de transporte dependientes de energía [102].

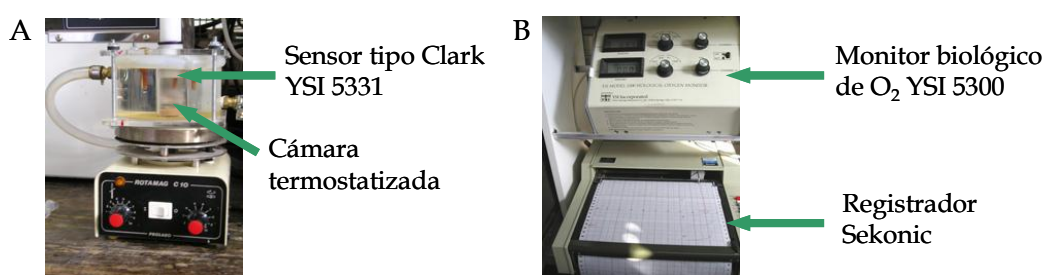
Se determinó el consumo de oxígeno de MOHs controles y preservados, durante la reoxigenación normotérmica. Se tomaron 1 o 2 MOHs a diferentes tiempos (0, 60 y 120 min), que fueron agregados a una cámara termostatzada, diseñada en nuestro laboratorio (ver figura 7A), la cual contiene un electrodo de Clark 5331 de YSI (Yellow Springs Instrument Co, Inc.). La cámara, que tiene un volumen de 10,5 mL, se completó con solución KH equilibrada con aire medicinal (KH-Aire): NaCl 114 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM; KCl 4,8 mM; MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM; CaCl<sub>2</sub> 1,5 mM; Glucosa 5 mM; Piruvato 1 mM; Hepes 10 mM; a 36 °C y pH 7,40. El contenido de oxígeno del medio de respiración equilibrado con aire (CO<sub>2</sub>) se determinó usando el método químico de Robinson y Cooper [103] y arrojó un valor de  $0,524 \pm 0,024 \mu\text{mol/mL}$  (n = 10) a 36 °C y una presión barométrica de 760 mmHg.

Se determinó la respiración basal o endógena, que es la velocidad con la que el tejido es capaz de consumir oxígeno utilizando los sustratos de los que dispone. Constituye un índice de la velocidad de consumo de oxígeno mitocondrial, acoplada a la síntesis de ATP, que depende de los requerimientos energéticos de la célula.

Luego de un período de estabilización de 2 minutos, la velocidad de consumo de oxígeno presentó una respuesta lineal que fue registrada en un registrador Sekonic (ver figura 7B) por 5 minutos, obteniéndose una recta. A partir de la pendiente de dicha recta, se calcula el % de disminución de la señal ( $\Delta s/\Delta t$ ) y se obtiene el consumo de oxígeno aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Velocidad de consumo de O}_2 (\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g tejido}^{-1}) = (C_{O_2} \times V_C \times \Delta s/\Delta t) \div (D \times P_T)$$

donde  $\text{CO}_2$  es el contenido de oxígeno en el medio de respiración ( $0,524 \mu\text{moles de O}_2/\text{mL}$ );  $V_C$  es el Volumen de la cámara ( $10,5 \text{ mL}$ );  $\Delta s/\Delta t$  es el porcentaje de disminución de la señal calculado como:  $\Delta s$ : señal inicial – señal final y  $\Delta t$ : tiempo de registro en minutos;  $P_T$  es el peso de los MOHs (g), y  $D$  son las divisiones de la escala del registrador luego de la calibración del sensor. Esta se realiza llenando la cámara con solución KH-Aire equilibrada con aire medicinal y ajustando la escala en un valor cercano al 100 %. Luego se agrega ditionito de sodio a esta solución, compuesto que consume todo el oxígeno disuelto en la misma, y se lleva la escala a 0. Este procedimiento se repite hasta tener valores constantes en ambos extremos de la escala.



**Figura 7:** Sistema utilizado para la determinación del consumo de  $\text{O}_2$  por MOHs controles y preservados. A) Cámara termostatzada y sensor de  $\text{O}_2$ . B) Monitor biológico y registrador.

### 3.1.2.5.2. Determinación del contenido de agua total

Los organismos adultos tienen una cantidad de agua total que está comprendida entre un 65 y un 70 % del peso corporal. El agua total puede considerarse distribuida en dos grandes fracciones [104]:

- *Agua extracelular*: agua distribuida en el compartimiento extracelular (incluye a los compartimientos vascular, intersticial, etc.).
- *Agua intracelular*: agua incluida dentro del compartimiento intracelular (separada de otros compartimientos por la membrana celular).

Se ha observado que los MOHs sufren edematización bajo una variedad de condiciones de incubación y, especialmente, cuando su metabolismo oxidativo se ve reprimido por frío, anoxia y venenos metabólicos [105].

Para evitar dicha expansión del espacio extracelular se agregan coloides a las soluciones de preservación [57]. En el caso de la solución BG35, el coloide



utilizado es el polietilenglicol (PEG) con un peso molecular de 35 kDa; mientras que en la solución ViaSpan® esta función la cumple el almidón hidroxietilado.

Con el fin de evaluar si los MOHs preservados en BG35 y ViaSpan® son capaces de regular su volumen de manera similar a los MOHs controles, se analizó el contenido de agua total. Esta determinación puede hacerse en base a dos principios distintos [104]:

- Por desecación del tejido
- Por método de dilución de una sustancia conocida, denominada marcador de volumen (por ejemplo, inulina para el espacio extracelular).

En este trabajo de tesis se utilizó el método de desecación. Para ello, se tomaron 2 MOHs a los distintos tiempos de reoxigenación (0, 60 y 120 minutos) y se pesaron sobre un trozo de papel de aluminio de peso conocido para determinar el peso húmedo ( $P_{\text{Hum}}$ ). Luego, se secaron en estufa a 90 °C hasta obtener un peso constante (aproximadamente 24 h) y se pesaron nuevamente para determinar el peso seco ( $P_s$ ).

El contenido de agua total se determinó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Agua Total (mL/g tejido seco)} = (P_{\text{Hum}} - P_s) \div P_s$$

### 3.1.2.5.3. Estudios sobre el metabolismo del amonio

#### Estudio sobre la expresión génica de CPSI y OTC

El Ciclo de la Urea consiste en 5 pasos enzimáticos, siendo la Carbamil Fosfato Sintetasa I (CPSI) y la Ornitina Transcarbamilasa (OTC) las enzimas que intervienen en la primera y segunda etapa, respectivamente. A pesar de que otros tejidos expresan alguna de las enzimas de este ciclo, sólo los hepatocitos poseen la capacidad metabólica de detoxificar amonio a urea [64,65]. Dado nuestro interés en el metabolismo del amonio, resultó atrayente evaluar el nivel de expresión génica de estas enzimas en los MOHs controles y preservados durante la reoxigenación normotérmica, y determinar si dicho nivel es afectado por el proceso de preservación hipotérmica. Para ello, a los 0, 60 y 120 minutos de reoxigenación normotérmica, se tomó un MOH y se lo conservó en N<sub>2</sub> líquido hasta el momento de su procesamiento.

*Aislamiento del ARN de muestras de MOHs controles y preservados*

La extracción de ARN total se realizó utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen, USA). La primera etapa del aislamiento del ARN total a partir de los MOHs consistió en la homogeneización del tejido con 1 mL de Trizol, utilizando un homogenizador ULTRA-TURRAX (T25 Basic, IKA® WORKS, INC). Luego, se siguieron los pasos detallados por el fabricante.

*Determinación de la concentración de ARN de las muestras*

La concentración de la preparación final de ARN fue obtenida midiendo la absorbancia de las muestras a 260 nm, longitud de onda a la cual absorben los ácidos nucleicos. Con el objetivo de estimar la pureza de la preparación de ARN obtenida, se determinaron las absorbancias a 230 nm (longitud de onda a la cual absorben el TRIS, EDTA, y otras sales del buffer, tiocianato de guanidinio) y a 280 nm (longitud de onda a la cual absorben las proteínas). Se consideran muestras con pureza aceptable aquellas cuya relación  $Abs_{260}/Abs_{280}$  se encuentre entre 1,7 y 2,1; y para las que la relación  $Abs_{260}/Abs_{230}$  sea mayor a 2,2. Para los análisis posteriores sólo se utilizaron aquellas muestras cuyas relaciones de absorbancia cumplieron con ambas condiciones.

*Análisis de la integridad del ARN purificado*

La integridad del ARN extraído a partir de las muestras de los MOHs fue controlado usando electroforesis en gel de agarosa-formaldehído. Para ello se preparó un gel horizontal de agarosa al 1 % en buffer MOPS 20X (MOPS 0,4 M pH= 7,00; acetato de sodio 0,2 M; EDTA 20 mM, pH = 8,00), conteniendo 5,55 % de formaldehído. Las muestras se mezclaron con buffer de carga [0,66 % formamida; 6,49 % formaldehído filtrado; MOPS 20X; H<sub>2</sub>O DEPC; colorante de agarosa (Blue/Orange 6X Loading Dye, Promega G190A) y 10 µg bromuro de etidio] en proporción buffer de carga/ muestra 3:1. Las muestras fueron calentadas durante 5 min a 65 °C y mantenidas en hielo hasta el momento de ser resueltas en el gel. Para la corrida electroforética, el voltaje se reguló a 3-4 V por cada centímetro de distancia entre los dos electrodos. En todos los casos, se cargó un pocillo con un marcador de peso molecular (0,5 mg/mL RNA ribosomal 18S + 28S de hígado de ternero; Sigma R0889). Tanto la etapa de preparación del gel como la corrida del

mismo se realizaron bajo campana de extracción. Una vez corrido el gel, el mismo se observó en un transiluminador de luz UV, se documentó (cámara KODAK Eda 290) y se analizó mediante el uso del programa KODAK 1D Image Analysis Software.

#### *Transcripción reversa*

A partir de 1 µg de ARN purificado se obtuvo el ADN copia (ADNc) simple hebra, utilizando el kit iScript™ cDNA Synthesis kit (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para llevar a cabo la reacción de transcripción reversa se utilizó un termociclador (Gene Amp PCR System 2400, Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) y se comenzó el siguiente programa de temperaturas:

- 5 minutos 25 °C
- 45 minutos 42 °C
- 5 minutos a 85 °C
- mantener a 4 °C

El ADNc obtenido fue almacenado a -80 °C hasta el momento de su utilización.

#### *Selección de los cebadores específicos para la RT-PCR en tiempo real*

Las secuencias del ARN mensajero (ARNm) de los genes de interés fueron obtenidas a partir de las publicadas en Genbank para la especie *Rattus norvegicus*. Los cebadores específicos fueron seleccionados de manera de obtener amplificadores de 120 pb y fueron controlados utilizando el programa Beacom Designer 2.0 (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, California, Estados Unidos). Las secuencias de los cebadores, el tamaño de los amplificadores y el número de acceso al Genbank se presentan en la Tabla 5. Los genes de la  $\beta$ -actina, de la GAPDH y del RNAr 18S fueron utilizados como control endógeno para normalizar la expresión de los genes en estudio.

TABLA 5: Secuencia de los cebadores utilizados para la RT-PCR en tiempo real

Cebadores	Tamaño del fragmento	Nº de acceso Genbank
CPSI 5'-ATCTGAGGAAGGAGCTGTCT-3' (sentido) CPSI 5'-AAAACCACTTGTCAATGGAT-3' (anti-sentido)	120 pb	NM_017072
OTC 5'-ATGACAGATGCAGTGTAGC-3' (sentido) OTC 5'-CAGGATCTGGATAGGATGAT-3' (anti-sentido)	120 pb	NM_013078
$\beta$ -ACT 5'-CAACCTTCTTGCCAGCTCCTC-3' (sentido) $\beta$ -ACT 5'-GACGAGCGCAGCGATATC-3' (anti-sentido)	79 pb	NM_031144.2
18S 5'-TAACCCGTTGAACCCCAATT-3' (sentido) 18S 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3' (anti-sentido)	150 pb	X01117
GAPDH 5'-CCATCACCATCTTCCAGGAG-3' (sentido) GAPDH 5'-CCTGCTTACCACCTTCTTG-3' (anti-sentido)	576 pb	NM_017008.4

*Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real*

Se trabajó con placas de 96 pocillos en las que se llevó a cabo, por separado, la PCR para cada gen de interés y control. Para la PCR en tiempo real se utilizó el kit iQ SYBR Green Supermix. En cada pocillo se preparó una mezcla conteniendo:

- 25 ng de ADNc
- 250 nM de cebador específico sentido y antisentido
- 12,5  $\mu$ L 1X iQ SYBR Green Supermix (100 mM KCl; 40 mM Tris-HCl, pH 8,4; 0,4 mM de cada dNTP; 50 U/ml iTaq ADN polimerasa; 6 mM  $MgCl_2$ ; SYBR Green I; 20 nM fluoresceína, y estabilizantes)

La placa se introdujo en el termociclador iCycler IQ (Bio-Rad Laboratories, Hércules, California, Estados Unidos) y se utilizó el siguiente programa de temperaturas:

- 3 min a 95 °C
  - 20 seg a 95 °C
  - 20 seg a 60 °C
  - 30 seg a 72 °C
  - 1 min a 95 °C
  - 1 min a 55 °C
- } 40 ciclos

Se realizaron 40 ciclos de desnaturalización, hibridación y síntesis. Para verificar la especificidad de la amplificación, inmediatamente luego del protocolo de amplificación, se realizó una curva de temperatura de fusión. Para ello, se

aplicó una rampa de temperatura donde se aumentó la misma desde 55 °C hasta 95 °C a razón de 0,5 °C cada 10 seg.

Con el objetivo de determinar la eficiencia de la amplificación, se realizó una curva de calibración utilizando un ADNc calibrador, el que fue elegido dentro de las muestras de ADNc. El mismo fue diluido en forma seriada y analizado tanto para los genes de interés como para los genes reporteros.

El análisis de expresión relativa se realizó utilizando el método de  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , normalizando los valores con los niveles de expresión de los transcritos correspondientes a los genes reporteros. La cantidad inicial de ADNc “molde” para cada muestra fue determinada como la expresión relativa respecto a la muestra escogida como referencia, que fue considerada como 1X. Dicha referencia corresponde a una muestra obtenida a partir de MOHs controles, al tiempo inicial de reoxigenación. Todos los experimentos de PCR en tiempo real fueron realizados por triplicado.

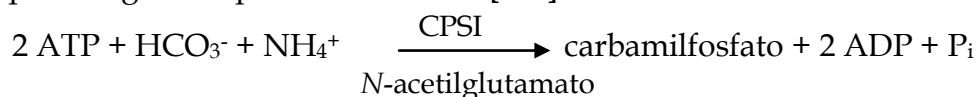
#### Análisis de la actividad enzimática de CPSI y OTC

Para complementar los estudios de expresión génica, se realizó la determinación de la actividad enzimática de CPSI y OTC con el fin de cuantificar también el nivel en el que ambas proteínas se encuentran presentes en MOHs controles y preservados.

Para ello, a los 0, 60 y 120 minutos de reoxigenación normotérmica se tomó un MOH, que fue almacenado en nitrógeno líquido hasta el momento de realizar las determinaciones enzimáticas. Inmediatamente antes de realizar dichas determinaciones, se prepararon homogenados de las distintas muestras al 5 % en solución fisiológica, con el fin de romper la membrana mitocondrial y liberar las enzimas.

#### *Determinación de la actividad enzimática de CPSI*

La actividad enzimática de CPSI fue determinada siguiendo el ensayo colorimétrico descrito por Pierson, que cuantifica a 458 nm la hidroxiiurea generada por el siguiente par de reacciones [106]:





La mezcla de reacción inicial consiste en 10  $\mu\text{mol}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ; 1  $\mu\text{mol}$  ATP; 2  $\mu\text{mol}$  acetato de magnesio; 1  $\mu\text{mol}$  N-acetil-L-glutamato; 0,2  $\mu\text{mol}$  ditioneol; 10  $\mu\text{mol}$  trietanolamina (pH 8,00) y una cantidad apropiada de muestra en un volumen final de 0,2 mL. Esta primera reacción transcurre durante 10 min a 37 °C y el carbamilfosfato resultante es convertido a hidroxiurea mediante la incorporación al medio de reacción de 0,01 mL de hidroxilamina 0,2 M y la posterior incubación de las muestras a 95 °C durante 10 min. Finalmente, para cuantificar la hidroxiurea, se agregan 0,8 mL de reactivo cromogénico a los distintos tubos y se incuban nuevamente a 95 °C durante 15 min. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se registra la absorbancia de las muestras a 458 nm. La concentración de hidroxiurea se determina utilizando una curva estándar.

El reactivo cromogénico está formado por volúmenes iguales de las soluciones A y B, las cuales se mezclan inmediatamente antes de usar. La solución A contiene 0,85 g de antipirina disueltos en 100 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 40 % V/V. La solución B contiene 0,625 g de diacetilmonoxima en 100 mL de ácido acético al 5 % V/V.

Para la determinación de la actividad CPSI en las distintas muestras, una vez obtenidos los homogenados en solución fisiológica, los mismos fueron centrifugados a 12100 g durante 5 minutos en una centrífuga minispin. Los sobrenadantes fueron luego tratados con una solución conteniendo 12,5 mg de ureasa disueltos en 500  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato 67 mM, pH 7,00. Para ello, se colocaron 180  $\mu\text{L}$  de una dilución apropiada del sobrenadante en solución fisiológica y 20  $\mu\text{L}$  de solución de Ureasa en tubos eppendorf, los cuales fueron incubados por 15 minutos a 37 °C. Este paso inicial tiene como objetivo eliminar la urea existente en las muestras, ya que la misma también reacciona con el reactivo cromogénico. Luego, se siguieron los pasos anteriormente descriptos. La actividad enzimática se expresó como U/g de tejido, donde U representa los  $\mu\text{moles}$  de carbamil fosfato formados por minuto a 37 °C.

*Determinación de la actividad enzimática de OTC*

Para la medida de la actividad enzimática de la OTC se utilizó el método descrito por Ceriotti [107], cuyo principio se basa en la siguiente reacción, catalizada por OTC:



La cantidad de citrulina formada por unidad de tiempo es una medida de la actividad de OTC.

De acuerdo con la técnica empleada, para cada muestra, se determina la absorbancia correspondiente a la cantidad de citrulina basal ( $A_{\text{basal}}$ ) y la total, registrada una vez finalizada la reacción enzimática ( $A_{\text{total}}$ ). La actividad de OTC se calcula haciendo la diferencia  $A_{\text{total}} - A_{\text{basal}}$  y utilizando una curva estándar de citrulina.

Para medir  $A_{\text{basal}}$  se mezclaron 0,05 mL de homogenado y 0,4 mL de una solución de ureasa (2,22 U/mL) en buffer fosfato 67 mM, pH 7,00. Para determinar  $A_{\text{total}}$ , a 0,05 mL de una dilución apropiada del homogenado en agua, se le agregaron 0,4 mL de solución ureasa/sustrato conteniendo 2,22 U/mL de ureasa; 12,5 mM carbamilfosfato y 25 mM ornitina, en buffer fosfato 67 mM, pH 7,00. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 15 min y luego se les agregaron 0,55 mL de ácido tricloroacético al 10 % P/V. Finalmente, fueron centrifugadas (14000 g, 5 min) y se determinó colorimétricamente la cantidad de citrulina en cada tubo.

Para esta última etapa, se mezclaron 0,75 mL del sobrenadante y 0,75 mL del reactivo de color, el cual se obtuvo al mezclar 2 volúmenes de la solución A con 1 volumen de la solución B. La solución A contiene 50 µg/mL  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , 4 µg/mL antipirina en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 40 %; mientras que la solución B contiene diacetilmonoxima al 0,5 % P/V en ácido acético al 5 %.

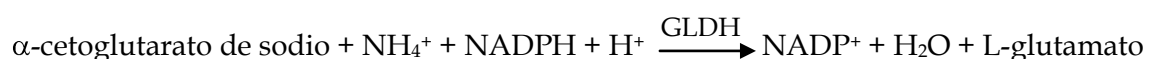
La actividad enzimática se expresó como U/g de tejido, donde U equivale a los µmoles de sustrato que reaccionan por minuto a 37 °C.

*Determinación de la capacidad de detoxificación de amonio*

La detoxificación de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) es una función específica de los hepatocitos. Durante la insuficiencia hepática severa, el hígado no es capaz de remover amonio de la sangre adecuadamente, con el consecuente aumento del

amonio y de su principal metabolito la glutamina. La acumulación de estos compuestos se considera un factor importante en la patogénesis de la encefalopatía hepática [108,109]. Es por ello que evaluamos la capacidad de detoxificación de una sobrecarga de  $\text{NH}_4^+$  como principal test funcional del componente biológico a ser utilizado en nuestro MBR.

Para poder determinar la concentración de amonio se empleó el método cinético propuesto por van Anken [110], que se fundamenta en la siguiente reacción:



La enzima glutamato deshidrogenasa (GLDH) cataliza la reacción de condensación del ión amonio con  $\alpha$ -cetoglutarato, oxidando una molécula de NADPH. Por lo tanto, el curso de la reacción puede seguirse midiendo la absorbancia de NADPH a 340 nm con un espectrofotómetro.

En una microcubeta de 1,5 mL se agregaron: 600  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato 66,7 mM, pH 8,30, conteniendo 0,14 mM NADPH y 6,5 mM  $\alpha$ -cetoglutarato de sodio, y 150  $\mu\text{L}$  de muestra. Se esperaron 5 minutos para que la solución alcance los 25 °C y se inició la reacción con el agregado de 50  $\mu\text{L}$  de solución enzimática conteniendo 120 UI/mL GLDH y 2,5 mM ADP.

Para elaborar la curva de calibración se prepararon soluciones estándar de  $\text{NH}_4^+$  (0,4; 0,2; 0,1 y 0,05 mM), a partir de una solución madre de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10 mM. Las absorbancias obtenidas para las muestras se extrapolaron en la curva para obtener las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  correspondientes.

Luego, la capacidad de detoxificación de amonio de los MOHs sometidos al SRN se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Detoxificación de } \text{NH}_4^+ (\mu\text{moles. g tejido}^{-1}) = (Q_i - Q_t) \div P_T$$

donde  $Q_i$  son los  $\mu\text{moles}$  de  $\text{NH}_4^+$  iniciales agregados como una sobrecarga a la solución KHA;  $Q_t$  son los  $\mu\text{moles}$  de  $\text{NH}_4^+$  remanentes al tiempo  $t$ , y  $P_T$  es el peso de los MOHs, expresado en gramos.

#### Determinación de la síntesis de urea

La síntesis de urea consume una gran porción del ATP disponible para el metabolismo celular, lo que implica que el aumento del contenido de urea en el



medio durante la reperfusión es una medida de la carga energética y de la capacidad biosintética del hígado.

Para cuantificar la urea presente en las distintas muestras se utilizó la técnica propuesta por Rahmatullah y Boyde [111]. La misma se basa en la reacción de dos moléculas de urea con dos de diacetil monoxima para dar un compuesto coloreado que absorbe a 525 nm. La presencia de  $\text{Fe}^{3+}$  en el reactivo cromogénico acelera la reacción y la tiosemicarbazida estabiliza el color resultante.

El reactivo cromogénico se prepara mezclando en proporción 2:1, respectivamente, los siguientes reactivos:

- *Solución de ácido férrico*: se disuelven 10 mg de  $\text{FeCl}_3$  en 100 mL de una mezcla conteniendo 10 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85 %, 30 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y 60 mL de agua destilada.
- *Solución de diacetil monoxima*: se disuelven 500 mg de este compuesto y 10 mg de tiosemicarbazida en 100 mL de agua destilada.

Las diferentes muestras fueron primero desproteinizadas con  $\text{HClO}_4$  al 5 % (relación 1:1). Luego, se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de la muestra tratada y 1,5 mL de reactivo cromogénico en tubos que fueron tapados y calentados durante 5 minutos en baño de agua a ebullición. Pasado el período de calentamiento, los mismos fueron colocados en un baño de agua fría para permitir que la mezcla alcance la  $T$  ambiente, al amparo de la luz. Finalmente, se midió la absorbancia a 525 nm, teniendo en cuenta que el color es estable por una hora.

Además, se construyó una curva de calibración utilizando un testigo de urea 5 mM, que recibió el mismo tratamiento que las muestras. Las concentraciones de urea de las diferentes muestras se obtuvieron por extrapolación.

Para cada tiempo (0, 60 y 120 minutos de reoxigenación), se calculó la capacidad de síntesis de urea según la siguiente fórmula:

$$\text{Síntesis de urea } (\mu\text{moles. g tejido}^{-1}) = [(C_t - C_i) \times V] \div P_T$$

siendo  $C_t$  la concentración de urea en el medio de reoxigenación luego de  $t$  minutos;  $C_0$  la concentración inicial;  $V$  el volumen de medio (5 mL) y  $P_T$  el peso de los MOHs (g).

### 3.1.2.6. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS

Los estudios histológicos se realizaron al principio y al final de la reoxigenación normotérmica, tanto para los grupos preservados como para el grupo control. Los MOHs fueron fijados por inmersión en formol al 10 % en PBS durante 24 hs. Luego, se procesaron histológicamente hasta su inclusión en parafina y se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina y fueron analizados por microscopía de campo claro, utilizando un microscopio Olympus BX40 conectado a una cámara digital Olympus, con una magnificación 200X.

### 3.1.3. PROFUNDIZACIÓN EN EL ESTUDIO DE LA PRESERVACIÓN HIPOTÉRMICA DE MOHs EN SOLUCIÓN BG35: EVALUACIÓN DEL AGREGADO DE CORM-3

Una vez comprobada la eficacia de la solución BG35 en la preservación de MOHs de rata, se decidió profundizar los estudios sobre la preservación de MOHs en la misma. Por ello, se incorporaron 2 nuevos grupos con el fin de establecer los posibles efectos protectores del agregado del compuesto dador de monóxido de carbono, CORM-3, a la solución BG35 sobre la preservación de la viabilidad y funcionalidad de MOHs de rata:

- Grupo CO-BG35, en el que los MOHs fueron almacenados a 0 °C por 48 h en solución BG35 con el agregado del compuesto CORM-3 (concentración final: 50  $\mu\text{M}$ ) y luego estudiados en el SRN (n = 3).
- Grupo iCO-BG35, en el cual los MOHs fueron preservados a 0 °C por 48 h en la solución BG35 con el agregado del compuesto CORM-3 inactivo (concentración final: 50  $\mu\text{M}$ ) y luego evaluados en el SRN (n = 3).

La preparación y el agregado de los compuestos CORM-3 y CORM-3 inactivo se realizaron como se describe a continuación. Cabe aclarar que, para la etapa de lavado del hígado durante la hepatectomía, se utilizaron 20 mL de solución BG35 con el agregado de CORM-3 o CORM-3 inactivo (concentración final: 50  $\mu\text{M}$ ) según correspondiese. Se realizaron nuevamente experimentos con MOHs control y MOHs preservados en BG35 para una mejor comparación entre grupos.

Los ensayos de viabilidad y funcionalidad evaluados fueron: liberación de LDH, consumo de oxígeno y capacidad de detoxificación de amonio. Los mismos fueron llevados a cabo según las técnicas ya descritas.

### **3.1.3.1. ADICIÓN DE LOS DISTINTOS COMPUESTOS A LA SOLUCIÓN DE PRESERVACIÓN**

#### **3.1.3.1.1. Preparación de CORM-3**

El glicinato de tricarbonil cloro rutenio (II) ( $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})]$  o CORM-3) fue sintetizado a partir del compuesto comercial CORM-2, según la técnica previamente descrita [112]. Inmediatamente antes de ser utilizado, el compuesto CORM-3 fue disuelto en agua destilada pura para obtener una solución stock de concentración 10 mM. Un volumen de esta solución concentrada se adicionó a 80 mL de la solución BG35, de manera de obtener una concentración final de CORM-3 en la misma de 50  $\mu\text{M}$ . Estudios previos mostraron que la adición de CORM-3 a la solución de preservación, en una concentración igual a la utilizada en estos experimentos, es capaz de liberar todo el CO disponible de una forma progresiva, con una vida media de liberación de 2 h [61].

#### **3.1.3.1.2. Obtención de CORM-3 inactivo**

Para ello, se preparó una solución stock (10 mM) de CORM-3 disuelto en PBS (pH 7,40) que fue mantenida a temperatura ambiente por 48 h. Previo a su uso, esta solución fue burbujeada con  $\text{N}_2$  por 10 minutos para eliminar el CO residual que pudiera estar todavía disuelto en la misma y, finalmente, un volumen de esta solución fue adicionado a la solución BG35 (concentración final: 50  $\mu\text{M}$ ). Dado que la sustancia bajo estudio contiene rutenio como metal de transición, este control se realiza para determinar los posibles efectos del mismo.

### **3.2. ESTUDIOS SOBRE EL DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL COMPONENTE ARTIFICIAL**

Como ya se expuso anteriormente, el objetivo de un HBA es suplir las funciones hepáticas y controlar el estado fisiológico y neurológico de pacientes con insuficiencia hepática aguda, hasta que el propio órgano pueda regenerarse o

hasta recibir un nuevo hígado [113]. Para que el HBA pueda cumplir con dicho objetivo, el sistema diseñado debe permitir el adecuado intercambio de sustancias entre la sangre y el compartimiento biológico, ofrecer un medio óptimo para el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad del componente celular, y ser apto para el uso en pacientes.

Por ello, resulta esencial caracterizar y optimizar en el minibiorreactor o componente artificial diseñado diferentes parámetros como la permeabilidad de las fibras, los niveles de oxigenación, entre otros, antes de realizar pruebas más específicas de validación, que incluyan también al componente biológico.

### **3.2.1. BREVE DESCRIPCIÓN DEL PRIMER MINIBIORREACTOR DISEÑADO**

El primer minibiorreactor (MBR) diseñado en nuestro laboratorio consta de un cartucho plástico cilíndrico, conteniendo entre 120 y 140 fibras huecas de material polimérico disponibles comercialmente [114]. Por el espacio intracapilar o compartimiento sanguíneo circula sangre fresca de carnero heparinizada (provista por el Bioterio Central de nuestra Facultad) y filtrada. El espacio extracapilar o compartimiento biológico queda definido entre la cubierta plástica y la superficie exterior de las fibras, y es el sitio reservado para el componente biológico. En los extremos del cartucho se encuentran dos conectores de polipropileno en forma de Y (Nalgene cat. 6152-0375), que contienen un puerto de acceso al espacio extracapilar cada uno y, a través de uno de estos conectores, ingresa también un tubo oxigenador de silicona (diámetro interno 0,078", diámetro externo 0,125"; cat. T5715-9, Baxter Healthcare Corporation, Estados Unidos) que aporta oxígeno al sistema, desde una fuente externa.

### **3.2.2. PROTOCOLO DE OPERACIÓN DEL SISTEMA**

Inicialmente, se toma una muestra de sangre basal; luego, se realiza el agregado de la sobrecarga de amonio, se homogeneiza adecuadamente y se toma la muestra a tiempo 0. El volumen de sangre restante se coloca en el reservorio destinado a tal fin. A partir del mismo, la sangre es impulsada por una bomba peristáltica hasta

llenar todo el sistema de perfusión, a través del cuál recircula a un flujo de 9 mL/min. Una vez que la sangre está circulando, se efectúa la carga de solución Krebs-Henseleit Amonio (KHA, ver su composición en la Tabla 4, página 53), en el compartimiento biológico del MBR. El dispositivo es luego operado en posición horizontal, sumergido en un baño termostatzado a 37 °C, por dos horas. Durante la perfusión, se introduce carbógeno (95% O<sub>2</sub>:5% CO<sub>2</sub>) al MBR a través del tubo oxigenador, a una presión constante de 85 mmHg.

Para poder realizar las diversas determinaciones necesarias para estandarizar el sistema, se tomaron muestras de sangre y del fluido extrafibras basal, y a los 0, 60 y 120 minutos de perfusión. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 12100 g por 3 minutos, en una centrífuga minispín.

### **3.2.3. CARACTERIZACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DE LOS MBRs**

Con el fin de caracterizar el funcionamiento del sistema *in vitro*, los diferentes MBR fueron perfundidos por 120 minutos, tiempo durante el cual se evaluaron algunos de los siguientes parámetros:

- *Evolución del hematocrito*, para determinar probables rupturas de algunas fibras y pasaje de sangre al compartimiento biológico, como así también estudiar el posible efecto de hemólisis por acción de la bomba peristáltica.
- *Evolución de la osmolalidad del plasma y del fluido contenido en el EEC*, con el propósito de monitorear la correcta transferencia de fluidos entre el compartimiento sanguíneo y el biológico.
- *Balance de diferentes metabolitos clave (amonio y glucosa) entre ambos compartimientos del MBR*, con el fin de determinar su correcta distribución en el MBR.

#### **3.2.3.1. MEDICIÓN DEL HEMATOCRITO**

Para poder determinar el valor de hematocrito de la sangre de carnero a los diferentes tiempos de perfusión se llenaron capilares con las muestras de sangre; los mismos fueron luego centrifugados durante 3 minutos a 12000 rpm en una centrífuga Rolco CH24. El hematocrito se calculó como el porcentaje que

representa el paquete de glóbulos rojos en el total (glóbulos rojos + plasma), luego de la centrifugación.

### 3.2.3.2. CUANTIFICACIÓN DEL GRADO DE HEMÓLISIS

Nuestro objetivo final es diseñar un modelo de HBA que sirva como dispositivo de asistencia hepática extracorporeal temporal para pacientes con falla hepática. En tal caso, la sangre del paciente circularía por el sistema durante el tiempo que dure el tratamiento, debiendo controlarse que no se produzca la ruptura de gran cantidad de eritrocitos ya que un aumento excesivo de la concentración de hemoglobina en plasma puede provocar problemas renales.

Surge por esto la necesidad de caracterizar el grado total de hemólisis que se genera en nuestro sistema debido a las condiciones de perfusión, temperatura y el pasaje a través de la bomba luego de 120 minutos de funcionamiento.

#### 3.2.3.2.1. Dosaje del contenido de hemoglobina en plasma

Para determinar el grado de hemólisis que se produce en el sistema durante las 2 horas de perfusión se necesita conocer la concentración de hemoglobina en las distintas muestras de plasma. Para ello, se utiliza el método de la oxihemoglobina, que se basa en la conversión de hemoglobina a oxihemoglobina en solución acuosa de amoníaco. La intensidad del color resultante se mide luego en un espectrofotómetro, utilizando una longitud de onda de 578 nm [115].

Para llevar a cabo las determinaciones se colocaron en un tubo perfectamente limpio 2,45 mL de una solución de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 0,1 % V/V y 0,05 mL de las diferentes muestras de plasma. Para la determinación en sangre total, se utilizaron 0,01 mL en 2,49 mL de reactivo. El contenido del tubo se mezcló y se dejó reposar a temperatura ambiente por 2 o 3 minutos. Posteriormente, se leyó la absorbancia resultante, siendo el color estable por varias horas. Los resultados se expresaron en gramos de hemoglobina cada 100 mL de solución, según la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido de hemoglobina} = (\text{UAbs} \times \text{PM} \times 10^{-1} \times V_f) \div (\epsilon \times b \times V_M)$$

donde **UAbs** es el valor de absorbancia de la muestra; **PM** es el peso molecular de la hemoglobina (16114 Da); **V<sub>f</sub>** es el volumen final del ensayo (2,5 mL);  $\epsilon$  es el coeficiente de absortividad molar para la hemoglobina a 578 nm

(15400 cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>); el camino óptico **b** es de 1 cm , y **V<sub>M</sub>** es el volumen de muestra (0,01 o 0,05 mL, según corresponda).

#### 3.2.3.2.2. Cálculo del grado de hemólisis

Una vez determinada la concentración de hemoglobina en las distintas muestras se procedió al cálculo del porcentaje de hemólisis a partir de la ecuación extraída de Arnaud y col. [116]:

$$\text{Hemólisis (\%)} = 100 \times [(\text{Hb}_M \times (1 - \text{Hto})) \div \text{Hb}_T]$$

donde **Hb<sub>M</sub>** es el contenido de hemoglobina, expresado en g/100 mL, de la muestra (plasma a tiempo 0, 60 o 120 minutos); **Hb<sub>T</sub>** es el contenido de hemoglobina total (en sangre entera), y **Hto** es el valor de hematocrito medido a los distintos tiempos.

#### 3.2.3.3. MEDICIÓN DE LA OSMOLALIDAD DE LAS MUESTRAS

La osmolalidad del plasma y del fluido extrafibras, a los distintos tiempos, fue medida utilizando un osmómetro de descenso crioscópico Osmomat 030 (Gonotec, GmbH, Berlin, Alemania).

#### 3.2.3.4. DISTRIBUCIÓN DE AMONIO ENTRE AMBOS COMPARTIMIENTOS DE LOS MBRs

Resulta esencial determinar el perfil de distribución del NH<sub>4</sub><sup>+</sup> entre ambos compartimientos del MBR para descartar la existencia de interacciones de este compuesto con componentes de la membrana o la pérdida de masa a través de algún elemento del sistema. Esta información es, además, importante para conocer la tasa real de detoxificación de amonio por parte del componente biológico.

##### 3.2.3.4.1. Determinación de la concentración de amonio

La concentración de amonio en las diferentes muestras se determinó utilizando el método enzimático descrito previamente.

##### 3.2.3.4.2. Cálculo del balance de masas de amonio en los MBRs

Para determinar la masa total de amonio a los distintos tiempos se realizaron los siguientes cálculos:

$$\left. \begin{aligned} Q_{P,0} &= ([A]_{P,0} \times V_{P,0}) - ([A]_{P,Bas} \times V_{P,0}) = A \\ Q_{CB,0} &= ([A]_{CB,0} \times V_{CB,0}) - ([A]_{CB,Bas} \times V_{CB,0}) = B \end{aligned} \right\} \boxed{Q_{T0} = A + B}$$

$$\left. \begin{aligned} Q_{P,60} &= ([A]_{P,60} \times V_{P,60}) - ([A]_{P,Bas} \times V_{P,60}) = A' \\ Q_{CB,60} &= ([A]_{CB,60} \times V_{CB,60}) - ([A]_{CB,Bas} \times V_{CB,60}) = B' \end{aligned} \right\} \boxed{Q_{T60} = A' + B'}$$

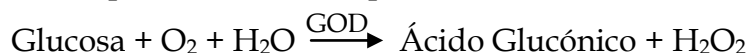
$$\left. \begin{aligned} Q_{P,120} &= ([A]_{P,120} \times V_{P,120}) - ([A]_{P,Bas} \times V_{P,120}) = A'' \\ Q_{CB,120} &= ([A]_{CB,120} \times V_{CB,120}) - ([A]_{CB,Bas} \times V_{CB,120}) = B'' \end{aligned} \right\} \boxed{Q_{T120} = A'' + B''}$$

donde  $[A]_{P,t}$  es la concentración de amonio en las muestras de plasma basal, y a los tiempos 0, 60 y 120 minutos de perfusión;  $[A]_{CB,t}$  es la concentración de amonio en las muestras de fluido del compartimiento biológico basal y a los 0, 60 y 120 minutos;  $V_{P,t}$  y  $V_{CB,t}$  son los volúmenes de sangre y fluido extrafibra a los distintos tiempos, respectivamente;  $Q_{P,t}$  y  $Q_{CB,t}$  es la masa de amonio en sangre y en el compartimiento biológico, a los distintos tiempos, respectivamente, y  $Q_{Tt}$  es la masa total de amonio al tiempo t.

### 3.2.3.5. DISTRIBUCIÓN DE GLUCOSA EN EL SISTEMA

La glucosa constituye uno de los principales combustibles metabólicos para el componente biológico, por lo que resulta fundamental su distribución homogénea en todo el sistema para asegurar un nivel adecuado de este metabolito en el fluido extracapilar. Por esta razón, se estudió la distribución de la glucosa entre la sangre y el compartimiento biológico, durante los 120 minutos de perfusión.

La determinación de la concentración de glucosa se realizó utilizando el kit “Glicemia Enzimática AA”, producido por Laboratorios Wiener. El método de dosaje se fundamenta en la siguiente secuencia de reacciones enzimáticas, cuyo producto final es un compuesto coloreado que absorbe a 505 nm:



**GOD:** Glucosa oxidasa, **POD:** Peroxidasa

Para llevar a cabo la reacción, se siguió el procedimiento recomendado por el fabricante. En un tubo, se colocaron 10 µL de muestra o de la solución estándar



provista en el kit, y 1 mL de buffer fosfato, pH 7, en el que se encuentran disueltas las enzimas, la 4-aminofenazona y el 4-hidroxibenzoato. El contenido del tubo se mezcló y se incubó por 25 minutos a temperatura ambiente. Se determinó la absorbancia a 505 nm; el color de la reacción final es estable por 30 minutos.

La concentración de glucosa en las diferentes muestras se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$[\text{Glucosa}]_M = ([\text{Glucosa}]_S \times \text{Abs}_M) \div \text{Abs}_S$$

donde  $[\text{Glucosa}]_S$  es la concentración de glucosa en la solución estándar (5,55 M o 1 g/L);  $\text{Abs}_M$  y  $\text{Abs}_S$  corresponden a los valores de absorbancia determinados para las diferentes muestras y la solución estándar, respectivamente.

#### **3.2.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS FIBRAS UTILIZADAS EN LA CONSTRUCCIÓN DE LOS MBRs**

El transporte de compuestos a través de la membrana de las fibras huecas afecta directamente la viabilidad y funcionalidad del componente biológico y, por lo tanto, la performance del biorreactor. Por ello, se caracterizaron diferentes parámetros relacionados con la difusión y la transferencia de solutos a través de las fibras utilizadas.

##### **3.2.4.1. ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE AMONIO Y GLUCOSA**

Como se expuso anteriormente, se estudiaron las distribuciones de amonio y glucosa en los MBRs para mostrar, entre otras cosas, la libre difusión de estos metabolitos a través de las distintas fibras utilizadas.

### 3.2.4.2. DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN DE FILTRACIÓN

El intercambio de agua y solutos a través de las membranas de las fibras huecas se produce por transporte difusivo, en el que los solutos se mueven a favor de su gradiente de concentración, y por transporte convectivo o ultrafiltración, en el que el solvente (agua) y los solutos se mueven conjuntamente siguiendo un gradiente de presión transmembrana existente entre ambos compartimentos. Dicho gradiente es el resultante de un balance entre varias presiones que operan sobre los fluidos presentes (hidrostática, osmótica y oncótica) [83].

Un parámetro importante, que permite caracterizar la capacidad de filtración de las fibras utilizadas en la construcción del MBR, se conoce como Fracción de Filtración (FF) [117]. Este factor representa la fracción de agua plasmática que es removida por ultrafiltración y se calcula como:

$$FF (\%) = (VFR \times 100) \div Q_p$$

La velocidad de flujo del ultrafiltrado (**VFR**, mL/min) se determinó midiendo la velocidad con la que el fluido del compartimiento biológico es impulsado a través de un catéter colocado en uno de los puertos de acceso al mismo. A su vez, el flujo plasmático (**Q<sub>p</sub>**) se calculó de la siguiente manera:

$$Q_p = BFR \times (1 - \text{Hematocrito})$$

La velocidad de flujo de la sangre (**BFR**) es de 9 mL/min, mientras que el **hematocrito** es determinado de rutina en todas las muestras de sangre analizadas (ver sección 3.2.3.1.).

### 3.2.4.3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR FPLC

La membrana de las fibras utilizadas constituye una barrera de selectividad, ya que el tamaño de sus poros regula el intercambio de sustancias entre ambos compartimentos del MBR. Para profundizar en el estudio de las propiedades difusivas de las fibras empleadas, resultó interesante determinar si las proteínas plasmáticas, especialmente aquellas pertenecientes al sistema inmune (anticuerpos, sistema del complemento), pueden pasar hacia el espacio extracapilar y provocar alteraciones en el componente biológico. Este análisis se

realizó utilizando Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas (FPLC, del inglés Fast Protein Liquid Chromatography).

Para ello, se tomaron muestras de plasma basal, y del fluido extrafibra a los 60 y 120 minutos de perfusión. Estas muestras fueron analizadas por Cromatografía de Filtración en gel. Para ello, se centrifugaron a 12100 g por 5 minutos y, luego, se filtraron utilizando filtros de jeringa para HPLC. Finalmente, se sembraron 100  $\mu$ L de muestra en una columna Tricorn Superdex-200 (30 x 1 cm, GE Healthcare, Suecia), equilibrada con buffer Tris 50 mM:NaCl 150mM, pH 7,00, previamente degaseado por filtración al vacío. La columna se manipuló mediante un equipo ÄKTA-Prime (GE Healthcare, Suecia), a un flujo constante de 0,5 mL/min. Cada muestra fue analizada por duplicado.

Los cromatogramas se registraron midiendo absorbancia a 280 nm y, para determinar el peso molecular de las proteínas presentes en las diferentes muestras, se realizó una curva de calibración utilizando el kit Molecular Weights 29000 - 700000, siguiendo las instrucciones del proveedor (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, Estados Unidos).

### **3.2.5. ESTUDIO DE LA PROVISIÓN DE OXÍGENO EN LOS MINIBIORREACTORES**

Debe prestarse especial atención a la oxigenación del componente biológico dentro del biorreactor, dado que el oxígeno juega un rol clave en la viabilidad y funcionalidad de los hepatocitos. Las condiciones de anoxia derivan en un aumento gradual de la permeabilidad de la membrana plasmática, lo que lleva al inicio de la muerte celular [96]. Por ello, se decidió evaluar si la provisión de oxígeno en el MBR es adecuada para mantener al componente celular viable y funcional dentro del mismo.

En el modelo de HBA diseñado, existen dos vías que proveen de oxígeno al componente biológico: el tubo oxigenador de silicona y la sangre de carnero utilizada en la perfusión. Ambas vías han sido estudiadas por separado para determinar su contribución individual.

### 3.2.5.1. MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO DEL OXIGENADOR INTERNO

Las membranas permeables a gases ofrecen la posibilidad de introducir oxígeno en una suspensión celular sin la formación de burbujas, evitando los problemas de generación de espuma y el daño celular asociado. El oxígeno difunde a través de los poros de la membrana, impulsado por una diferencia en su presión parcial ( $pO_2$ ), y se disuelve en el medio celular. El flujo de oxígeno a través de una dada membrana está determinado por el llamado *coeficiente total de transferencia de masa* ( $k_m$ , cm/min), que representa el recíproco de la resistencia o de la combinación de todas las posibles resistencias a la difusión [118]. Este coeficiente se calcula a partir de la pendiente de la gráfica  **$\ln [1-Y(t)]$  versus tiempo**; siendo  $Y(t)$  la señal normalizada de la sonda de  $pO_2$ :  $Y(t) = C_t/C_{sat}$ , donde  $C_t$  es la concentración de oxígeno en la solución a tiempo  $t$  y  $C_{sat}$  es la concentración a saturación.

Una vez obtenido el valor de  $k_m$  para una dada membrana, puede calcularse el flujo total transmembrana de oxígeno ( $N_T$ ,  $\mu\text{mol/min}$ ) como:

$$N_T = k_m \times A \times C_{sat}$$

siendo  $A$  el área de la membrana en  $\text{cm}^2$ .

Para determinar los valores de  $k_m$  y  $N_T$ , se utilizó la cámara que se muestra en la Figura 7A, cuyo volumen es de aproximadamente 25 mL. Este biorreactor se llenó con solución KHA (ver Tabla 4), la cual fue burbujeada con una mezcla conteniendo 95%  $N_2$ :5%  $CO_2$  hasta alcanzar un nivel mínimo de  $O_2$  disuelto ( $4,3 \pm 3,0\%$ ,  $n=3$ ). En la tapa de la mencionada cámara se encuentran ubicados: el sensor de  $O_2$ , conectado a un registrador Sekonic (figura 7B); el tubo oxigenador de silicona ( $A = 3,24 \text{ cm}^2$ ), a través del cual se introdujo carbógeno a una presión de 85 mmHg, y una válvula de escape que evita el aumento de presión dentro de la cámara. La muestra se mantuvo a  $37^\circ\text{C}$  mediante la recirculación de agua por el compartimiento que rodea al minirreactor, utilizando un baño termostatzado. La velocidad de agitación fue de 450 rpm y la señal se registró de manera continua hasta alcanzar la saturación del medio.

Las  $pO_2$  se determinaron mediante una sonda amperométrica YSI 5331, conectada a un monitor biológico de oxígeno YSI modelo 5300 (Yellow Springs Instruments Co., Inc., Yellow Springs, Ohio, Estados Unidos; ver figura 7). Para obtener los valores de concentración de oxígeno a partir de las presiones parciales medidas, se utilizó el valor de solubilidad de dicho gas en agua a 37 °C,  $S_{O_2}^{37^\circ C} = 10,56 \mu\text{mol}/\text{dm}^3/\text{kPa}$ , obtenido de Gnaiger [119].

Previamente a la realización de las determinaciones ( $n=3$ ), el sensor fue calibrado. Inicialmente, se calibró el 95 % de  $O_2$ , por saturación de la cámara con carbógeno húmedo. Luego, la cámara se saturó con nitrógeno medicinal húmedo para poder ajustar el 0 en la escala. Este procedimiento fue repetido hasta obtener lecturas constantes para ambos extremos de la escala.

### 3.2.5.2. DETERMINACIÓN DEL APORTE DE OXÍGENO POR LA PERFUSIÓN SANGUÍNEA

En el MBR diseñado en nuestro laboratorio, la sangre circula por el lumen de las fibras capilares huecas, quedando así separada del componente biológico, ubicado en el espacio extrafibra. Los poros en la pared de estas fibras dejan pasar compuestos de tamaño inferior a los 50 kDa, por lo que el oxígeno transportado por la sangre debería poder difundir libremente entre ambos compartimientos y suplir la demanda metabólica celular. La mayor parte de este oxígeno se transporta combinado con la hemoglobina y el resto disuelto en el plasma; el contenido total de este gas en sangre puede calcularse mediante la siguiente ecuación [120]:

$$\text{Contenido de } O_2 (\text{vol } \%) = [(\text{Hb}_M \times 1,34 \times \% \text{ saturación de } O_2) \div 100] + (pO_2 \times 0,003)$$

siendo  $\text{Hb}_M$  la cantidad de hemoglobina presente en la muestra, en g/dL. El primer término de la ecuación anterior corresponde al oxígeno unido a hemoglobina; debe tenerse en cuenta que cada gramo de la misma puede liberar como máximo 1,34 mL de dicho gas [121]. El segundo término representa la porción disuelta en el plasma; debe considerarse que, a una presión arterial

normal de 95 mmHg, aproximadamente 0,29 mL de oxígeno se disuelven por cada dL de agua en la sangre.

Para determinar el contenido de oxígeno sanguíneo, se siguió el protocolo de operación detallado en la sección 3.2.2. A los 0, 30, 60 y 120 minutos, se tomaron muestras de sangre, en las que se determinaron el contenido de hemoglobina, las presiones parciales de oxígeno y dióxido de carbono, y el porcentaje de saturación, utilizando un analizador de gases en sangre AVL 500 Compact 3 (Roche, USA).

#### **3.2.5.2.1. Cuantificación del pasaje de oxígeno desde la sangre hacia el compartimiento biológico**

Se siguió el protocolo detallado en la sección 3.2.2., teniendo en cuenta que el compartimiento biológico se llenó con solución KHA burbujeada con CO<sub>2</sub> 10,2% (balance N<sub>2</sub>) por aproximadamente 45 minutos, con el fin de eliminar la mayor cantidad posible del oxígeno disuelto en la misma y, a su vez, poder mantener el pH. Los experimentos (n=3) se realizaron sin aporte de carbógeno a través del tubo oxigenador; a los 0, 60 y 120 minutos de perfusión se tomaron muestras de sangre y de fluido extrafibra. En las muestra de sangre se determinaron las presiones parciales de oxígeno y dióxido de carbono utilizando un analizador de gases en sangre AVL 500 Compact 3 (Roche, Estados Unidos). En las muestras de solución extrafibra, se determinaron las pO<sub>2</sub> mediante la sonda amperométrica YSI 5331 y el monitor biológico de oxígeno YSI modelo 5300 anteriormente descriptos (Yellow Springs Instruments Co., Inc., Yellow Springs, Ohio, Estados Unidos).

### **3.3. ESTUDIOS SOBRE LA VALIDACIÓN IN VITRO DE LOS MINIBIORREACTORES**

Como etapa final de la caracterización in vitro de nuestro modelo de HBA, se realizó la etapa de validación, evaluando el desempeño de los MOHs, tanto controles como preservados, en los MBR diseñados.

#### **3.3.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL GENERAL**

Se siguió el mismo protocolo experimental detallado en la Figura 5, con la diferencia de que los MOHs fueron reoxigenados en los distintos MBR diseñados.

### 3.3.1.1. GRUPOS EXPERIMENTALES

Se trabajó con los 3 grupos experimentales que se detallan a continuación:

- *Grupo control*: luego de su obtención, los MOHs fueron sometidos a un período de preincubación (15 minutos en solución KHB a 37 °C, bajo atmósfera de carbógeno), con el fin de obtener una población más homogénea y favorecer así la reproducibilidad en el muestreo posterior. Finalmente, se evaluó su performance como componente biológico en los distintos MBR diseñados.
- *Grupo ViaSpan®*, en el que los MOHs fueron almacenados a 0 °C por 48 h en solución UW comercial y luego estudiados en el MBR.
- *Grupo BG35*, en el cual los MOHs fueron preservados a 0 °C en la solución BG35 por 48 h y luego evaluados en el MBR.

### 3.3.1.2. REOXIGENACIÓN DE MOHs CONTROLES Y PRESERVADOS

Las metodologías empleadas para el corte y la preservación de MOHs planos ya fueron detalladas. En este caso, durante la etapa de reoxigenación, tanto el grupo control, luego del período de preincubación, como los grupos preservados, luego de las 48 h de almacenamiento en frío, fueron evaluados en los MBR diseñados.

Se siguió el protocolo de operación del MBR ya descrito, teniendo en cuenta que en el espacio extracapilar se colocó una masa de 1 g de MOHs en solución KHA. Durante la reoxigenación, se tomaron muestras a los 0, 60 y 120 minutos para evaluar la viabilidad y funcionalidad de los mismos. Las determinaciones del contenido de hemoglobina y glucosa, hematocrito y osmolalidad ya detalladas se realizaron de rutina en las muestras de sangre, plasma o fluido extrafibra, según corresponda.

### 3.3.1.3. ENSAYOS DE VIABILIDAD

Los parámetros de viabilidad evaluados durante el período de reoxigenación en el MBR fueron la liberación de LDH y la evolución del contenido de glucógeno. Se utilizaron las técnicas y ecuaciones previamente descriptas para el SRN.

### 3.3.1.4. ESTUDIOS FUNCIONALES

Se analizaron el consumo de oxígeno, el contenido de agua total, y la expresión génica y la actividad de las enzimas CPSI y OTC, utilizando las técnicas y ecuaciones ya explicitadas para el SRN.

Para determinar la capacidad de detoxificación de amonio se utilizó la técnica enzimática ya descrita para cuantificar la cantidad de amonio en las distintas muestras. Para el cálculo de la eficiencia de detoxificación, se obtuvieron primero los valores de  $Q$  ( $\mu\text{moles de NH}_4^+$ ). Luego se calculó el porcentaje de dosis detoxificada empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Dosis inicial detoxificada (\%)} = 100 - [(Q_t \times 100) \div Q_0]$$

donde  $Q_0$  y  $Q_t$  se definen como la masa total de amonio en el sistema a tiempo 0 y a tiempo  $t$  (60 y 120 minutos), respectivamente.

Por otro lado, también se calcularon los  $\mu\text{moles de NH}_4^+$  detoxificados por gramo de tejido húmedo como:

$$\text{Detoxificación de NH}_4^+ (\mu\text{moles. g tejido}^{-1}) = (Q_0 - Q_t) \div P_T$$

siendo  $P_T$  el peso de los MOHs en gramos.

### 3.3.1.5. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS

Los mismos se realizaron al principio y al final de la etapa de reoxigenación en el MBR, tanto para los grupos preservados como para el grupo control. Se siguió la técnica detallada anteriormente.

## 3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

En todos los casos, los valores corresponden al promedio  $\pm$  el desvío estándar del grupo experimental. El número de réplicas ( $n$ ) utilizado se encuentra explicitado en cada uno de los diferentes análisis, siendo siempre 3 o superior. Los datos fueron comparados utilizando ANOVA a dos factores (tiempo y tratamiento). Se realizó la validación del modelo mediante análisis de los residuos y, en el caso de no verificarse los supuestos, se aplicó el logaritmo de la variable, logrando dicha verificación. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ .



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 4.1. ESTUDIOS SOBRE EL COMPONENTE BIOLÓGICO, SU OBTENCIÓN Y PRESERVACIÓN

En un HBA, el componente biológico es el encargado de llevar a cabo las funciones que el hígado de un paciente con FHA no puede realizar. Idealmente, las células hepáticas mantenidas dentro de un biorreactor deberían desarrollar todas las funciones de un hígado normal. Para alcanzar este objetivo, como el hígado contiene varias subpoblaciones celulares, no deberían estar presentes sólo los hepatocitos, que son las principales células metabólicamente activas. El componente biológico también debería contener, por ejemplo, células de Kupffer, endoteliales y de Ito que provean de componentes de la matriz extracelular y factores de crecimiento [26]. En la búsqueda de este ideal, durante el desarrollo de esta tesis, decidimos evaluar el uso de microórganos hepáticos (MOHs) como biocomponente de nuestros prototipos. Los MOHs son cortes de hígado que mantienen la heterogeneidad celular y las interacciones célula-célula, dentro de la matriz tisular original [39].

Por otro lado, para que un HBA se convierta en una herramienta terapéutica útil, se debe disponer del componente biológico en cantidad y calidad, y en el lugar y tiempo en el que sea necesario. Para ello, resulta imprescindible desarrollar métodos de preservación adecuados para mantener al biocomponente viable y funcional, de manera de poder utilizarlo clínicamente cuando sea requerido. Por esto, previo al uso de los MOHs dentro de nuestro modelo de HBA, se optimizaron los métodos de obtención y preservación de los mismos. Los resultados alcanzados durante estas etapas se discutirán en el presente capítulo.

#### **4.1.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE OBTENCIÓN DE MOHs**

Para conservar su viabilidad y funcionalidad, los MOHs deben tener un espesor que permita la rápida difusión de nutrientes y el intercambio de gases. Si son demasiado gruesos ( $> 500 \mu\text{m}$ ), comienzan a mostrar injurias en su interior, donde la difusión de oxígeno se vuelve limitante; mientras que si son demasiado finos ( $< 200 \mu\text{m}$ ), presentan una gran proporción de células dañadas en la superficie, comparado con el número de células sanas en el centro [39].

Con el fin de lograr cortes finos y homogéneos, durante este trabajo, se optimizó la metodología de obtención de MOHs. Para ello, se utilizó la técnica

manual de corte descrita en el capítulo de Materiales y Métodos (ver página 51), con la que se obtuvieron MOHs de un espesor de  $338 \pm 27 \mu\text{m}$  ( $n=25$ ). Como puede apreciarse, los cortes preparados presentan un grosor uniforme, que se encuentra dentro del rango óptimo mencionado anteriormente.

En la literatura, ha sido reportado que los MOHs obtenidos manualmente son de inferior calidad a los obtenidos con instrumentos de precisión, como el cortador Krumdieck o el Brendel-Vitron, los que pueden ajustarse para obtener cortes del espesor deseado. En el caso de fijar el espesor entre 250 y 300  $\mu\text{m}$  (valores empleados para MOHs), estos aparatos permiten obtener cortes de  $269 \pm 12 \mu\text{m}$  y  $275 \pm 9 \mu\text{m}$ , respectivamente ( $n = 4$ ) [122].

Para poder comparar la homogeneidad de nuestros cortes obtenidos manualmente con los obtenidos utilizando los instrumentos mencionados anteriormente, resultó adecuado calcular los errores estándares (EE), ya que los tamaños de las muestras son diferentes para cada caso. El error estándar se calculó como:  $\text{EE} = \text{desvío estándar} / \sqrt{n}$ , lo que arrojó los siguientes valores:

*Cortador Krumdieck:*  $\text{EE} = 6$

*Cortador Brendel-Vitron:*  $\text{EE} = 4,5$

*Nuestra técnica manual:*  $\text{EE} = 5,4$

Dado que se observan valores de EE similares, podemos inferir que la homogeneidad de los cortes obtenidos por los distintos métodos es equivalente. Estos resultados sirven para validar nuestra técnica manual de corte: la misma permite obtener MOHs de un espesor adecuado y con una alta reproducibilidad.

#### **4.1.2. ESTUDIOS SOBRE LA PRESERVACIÓN HIPOTÉRMICA DE MOHs**

La preservación por isquemia fría consiste en el almacenamiento estático de un sistema biológico en frío (0 a 4 °C), en anoxia (bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ ) y en una solución especialmente diseñada para tal fin. Fue el método elegido para la preservación de MOHs en esta tesis, ya que se trata de una técnica simple, económica y que permite contar con el material preservado rápidamente [52].

Para poder contar con una solución adecuada para la preservación de MOHs, nuestro equipo de trabajo desarrolló la solución BG35, cuyos componentes principales son [58]:

- Gluconato como anión impermeable.
- BES y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como agentes buffer.
- PEG de 35 kDa como soporte oncótico.

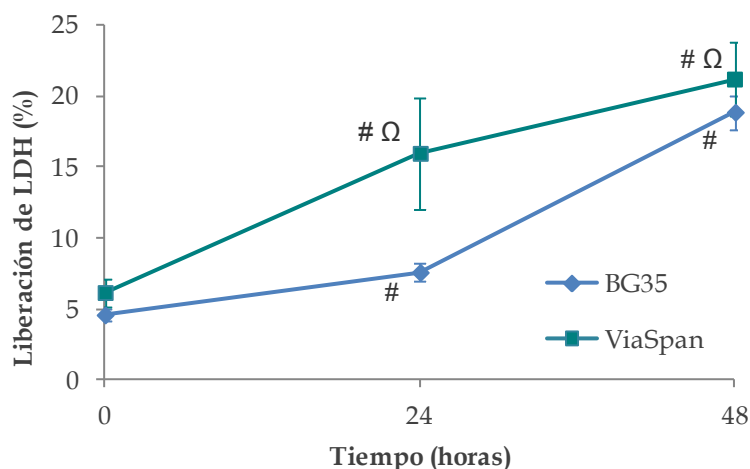
BG35 demostró tener la misma eficacia que ViaSpan® para proteger MOHs de rata frente a las injurias debidas a la isquemia fría y a la reoxigenación [58]. En este trabajo de tesis se profundizó en el estudio de la preservación de MOHs de rata en esta solución BG35, haciendo hincapié en la evaluación del metabolismo de amonio durante la etapa de reoxigenación. Como ya fuera mencionado, previo a su uso en un HBA, es fundamental constatar que el componente biológico elegido mantenga su capacidad para detoxificar amonio, ya que la acumulación en sangre de dicho metabolito es el principal agente causal de los daños neurológicos asociados a la FHA.

#### 4.1.2.1. EVOLUCIÓN DE LA VIABILIDAD DE MOHs PRESERVADOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN FRÍO

Con el fin de determinar la eficacia de las soluciones utilizadas para proteger a MOHs de rata de los daños que ocurren durante la isquemia fría, se analizó la viabilidad de los mismos a través del ensayo de liberación de LDH. Esta es una técnica simple, rápida y precisa, que permite determinar cambios en la permeabilidad de la membrana celular durante el almacenamiento en frío.

En la Figura 8 puede apreciarse que, con el transcurso del tiempo de preservación, se produce un aumento significativo en el % de liberación de LDH para los dos grupos analizados (**BG35**:  $4,6 \pm 0,4$  %;  $7,6 \pm 0,6$  % y  $18,9 \pm 1,2$  %, y **ViaSpan®**:  $6,3 \pm 0,7$  %;  $16,9 \pm 0,7$  % y  $21,1 \pm 1,8$  %, luego de 0, 24 y 48 h, respectivamente; n = 3 en ambos grupos). Incrementos similares en los niveles de liberación de LDH por parte de MOHs, durante el período de preservación, han sido reportados por otros grupos de investigación [48,123]. Ésta pérdida parcial en la integridad de las membranas podría estar asociada a alteraciones que ocurren

debido tanto a las condiciones de isquemia como de hipotermia a las que es sometido el tejido durante este tipo de preservación.



**Figura 8:** Evolución de la Liberación de LDH (%) por MOHs preservados en las soluciones BG35 y ViaSpan®, durante el período de preservación. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

# diferente de los demás tiempos,  $p < 0,05$ ;  $\Omega$  diferente de BG35,  $p < 0,05$

Una consecuencia inmediata de la isquemia es la falta de oxígeno, que causa una rápida depleción del contenido de ATP celular. Esta pérdida de energía provoca despolarización de las membranas celulares, con aumento concomitante en las concentraciones intracelulares de calcio, y el cambio hacia un metabolismo anaeróbico, que progresivamente lleva al desarrollo de acidosis. Esta acumulación de protones desencadena la activación de hidrolasas lisosomales y de lipoproteína lipasas, e induce cambios conformacionales en la membrana. Por su parte, el  $\text{Ca}^{2+}$  activa diferentes fosfolipasas y enzimas proteolíticas. Todos estos eventos provocan daños en las membranas y contribuyen significativamente al aumento de su permeabilidad [55].

La hipotermia combate, en gran medida, los efectos mencionados de la isquemia al reducir la velocidad a la que ocurren los procesos químicos y físicos. Sin embargo, en esta protección, existe un compromiso entre los beneficios y los daños del frío. Así, las bajas temperaturas también pueden generar injurias en las membranas, ya que inducen cambios en el grado de fluidez de las mismas y provocan el pasaje desde un estado líquido cristalino fluido a uno altamente ordenado tipo gel. Para las proteínas de membrana es termodinámicamente desfavorable permanecer en la fase gel, por lo que las mismas se redistribuyen hacia regiones que aun se encuentren en fase líquida cristalina. Esta formación de

microdominios ricos en lípidos y otros ricos en proteínas deriva en un mal empaquetamiento de la membrana y un consiguiente cambio en su permeabilidad frente a iones e incluso grandes moléculas, como la enzima LDH, en este caso. Esta separación de fases provocada por la hipotermia en gran parte es revertida cuando el tejido es devuelto a condiciones normotérmicas [55].

En la Figura 8 también puede observarse que los dos grupos estudiados comenzaron el período de preservación con valores similares de liberación de LDH. Sin embargo, luego de 24 y 48 horas de almacenamiento en frío, la cantidad de enzima liberada por MOHs preservados en ViaSpan® fue estadísticamente superior a la del grupo BG35 ( $p < 0,05$ ). Esto demuestra que los MOHs de rata preservados en solución BG35 tienen una mayor capacidad para retener la enzima citosólica LDH que aquellos preservados en ViaSpan®.

La diferencia observada entre los dos grupos preservados puede deberse al efecto protector que ejerce el PEG de alto peso molecular sobre las membranas celulares. Este polímero es capaz de adsorberse a la superficie de las membranas, para estabilizar a los lípidos que la constituyen y mantener o restaurar la integridad de las mismas. Las moléculas de PEG adsorbidas sobre la superficie, rodeadas a su vez por un gran conjunto de agua estructurada, se comportan como una cubierta protectora que contribuiría a reducir la permeabilidad de las membranas celulares [57].

Los resultados expuestos, junto con los que ya fueron publicados con anterioridad [58], nos permiten aseverar que la solución diseñada en nuestro laboratorio, BG35, muestra una eficacia similar a la solución Gold Standard ViaSpan® para la preservación de la viabilidad de MOHs de rata durante el almacenamiento en frío.

#### **4.1.2.2. EVOLUCIÓN DE LA VIABILIDAD DE MOHs CONTROLES Y PRESERVADOS 48 H DURANTE LA REOXIGENACIÓN NORMOTÉRMICA**

Muchos de los efectos deletéreos producidos por la preservación en frío se exacerban o se ponen de manifiesto cuando las células, tejidos u órganos preservados son devueltos a condiciones de oxigenación y temperatura normales

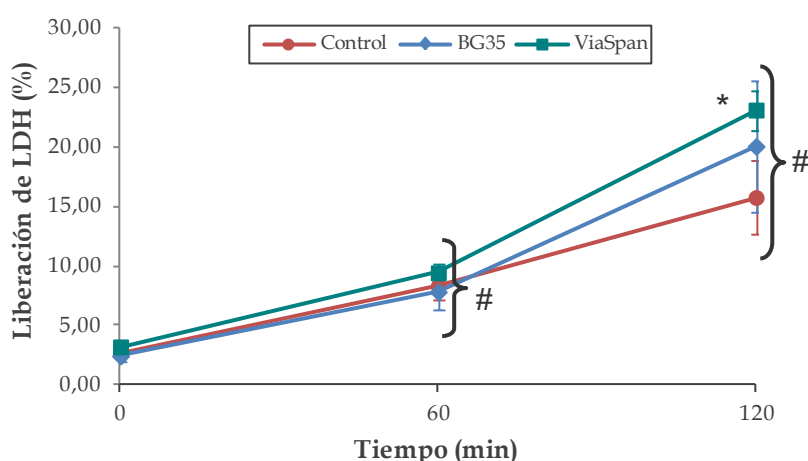
[55]. Por ello, una vez finalizado el período de almacenamiento en frío, resultó de interés analizar la viabilidad de MOHs preservados durante la etapa posterior de reoxigenación.

#### 4.1.2.2.1. Liberación de LDH

Ha sido previamente determinado que la liberación de enzimas citosólicas al medio de incubación, por cortes de hígado, refleja posibles alteraciones en la permeabilidad de las membranas [124]. Por ello, durante el período de reoxigenación normotérmica, también se evaluó la liberación de LDH como criterio de viabilidad.

En la Figura 9 puede apreciarse que, al inicio del período de reoxigenación, los MOHs preservados por 48 horas en las soluciones BG35 y ViaSpan® presentan valores de liberación de LDH similares a MOHs controles. Estos resultados demuestran, tal como fue expuesto anteriormente, la reversibilidad de los daños provocados por la hipotermia sobre las membranas celulares.

Por otro lado, la liberación al medio de la enzima citosólica LDH sufrió un incremento estadísticamente significativo con el tiempo de reoxigenación para todos los grupos estudiados (Figura 9), alcanzando los siguientes valores luego de los 120 min:  $15,8 \pm 3,1\%$  para el grupo control;  $20,1 \pm 5,6\%$  para BG35 y  $23,1 \pm 1,7\%$  para ViaSpan®.



**Figura 9:** Evolución de la Liberación de LDH (%) para MOHs control y MOHs preservados 48 h en las soluciones BG35 y ViaSpan®, durante el período de reoxigenación normotérmica. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SD, n = 3.

# diferente de los demás tiempos,  $p < 0,05$ ; \* diferente del grupo control,  $p < 0,05$ .



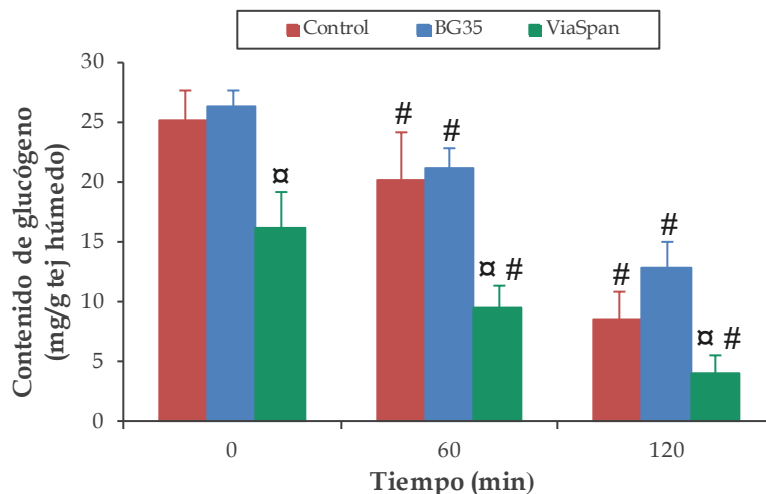
Luego de 2 horas a 37 °C, los MOHs preservados en ViaSpan® mostraron valores de liberación de LDH significativamente superiores a los controles, mientras que no se observó diferencia entre los grupos control y BG35. Esta mejor conservación en la integridad de membrana para MOHs que fueron preservados en BG35 puede atribuirse al efecto protector, ya explicado, que el PEG de alto peso molecular ejerce sobre las membranas. La capa protectora de moléculas de PEG, adherida a las membranas celulares, permanece por un tiempo luego del período de almacenamiento en frío, incluso a pesar del lavado que se le realiza al órgano o tejido para eliminar los restos de solución de preservación. En el caso de riñones que han sido preservados en soluciones conteniendo PEG y posteriormente trasplantados, se observó que la excreción urinaria de este polímero continúa hasta aproximadamente una semana post-trasplante [57].

#### 4.1.2.2.2. Evolución del contenido de glucógeno

La sensibilidad a la injuria debida a la isquemia fría y a la reoxigenación posterior puede estar relacionada con la falta de glucógeno como fuente de sustrato para el metabolismo celular. Por ello, se determinó el contenido de glucógeno remanente en el citoplasma de las células hepáticas durante el período de reoxigenación [100].

En la Figura 10 se muestra la variación en el contenido de glucógeno en función del tiempo de reoxigenación. Para todos los grupos analizados se observa una disminución significativa del contenido de glucógeno a medida que aumenta el tiempo de reoxigenación, lo que estaría indicando que el tejido se encuentra activo metabólicamente y debe consumir sus reservas de glucógeno para obtener energía y llevar a cabo los numerosos procesos que mantienen la integridad celular.

Durante toda la etapa de reoxigenación, los MOHs que fueron preservados en ViaSpan® presentaron un contenido de glucógeno significativamente menor al de los demás grupos estudiados (**Controles:**  $25,1 \pm 2,7$ ,  $20,1 \pm 4,2$  y  $8,5 \pm 2,5$ ; **BG35:**  $26,4 \pm 1,4$ ,  $21,1 \pm 1,8$  y  $12,8 \pm 2,3$ , y **ViaSpan®:**  $16,2 \pm 3,0$ ,  $9,6 \pm 1,8$  y  $5,3 \pm 2,3$  mg de glucógeno/g de tejido húmedo, a los 0, 60 y 120 min respectivamente,  $p < 0,05$ ).



**Figura 10:** Evolución del Contenido de glucógeno (mg/g tejido húmedo) para MOHs control y MOHs preservados 48 hs en las soluciones BG35 y ViaSpan®, durante el período de reoxigenación normotérmica. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SD, n = 3.

□ diferente de los demás grupos,  $p < 0,05$ ; # diferente de los demás tiempos,  $p < 0,05$ .

Numerosos investigadores han demostrado la importancia de la determinación del contenido de glucógeno como marcador de la competencia metabólica y se ha sugerido que el mismo representa un indicador más sensible que el contenido de ATP o Glutathione [100]. Por ello, en este trabajo de tesis, se determinó el contenido de glucógeno como un importante criterio de viabilidad que incide, a su vez, en la funcionalidad del tejido.

Las diferencias encontradas al inicio del período de reoxigenación muestran que los MOHs preservados en ViaSpan® culminan el período de preservación con un contenido de glucógeno severamente disminuido respecto a los preservados en BG35. Esto podría deberse a alteraciones sufridas durante el almacenamiento en frío que podrían afectar la posterior funcionalidad de los MOHs, al contar con menores reservas energéticas para enfrentar la etapa de reoxigenación.

Es importante señalar que, durante toda la etapa de reoxigenación, los MOHs que fueron preservados en BG35 mantuvieron un contenido de glucógeno y una variación en los niveles de este metabolito similares al de MOHs frescos, demostrando así una competencia metabólica semejante a la del grupo control.

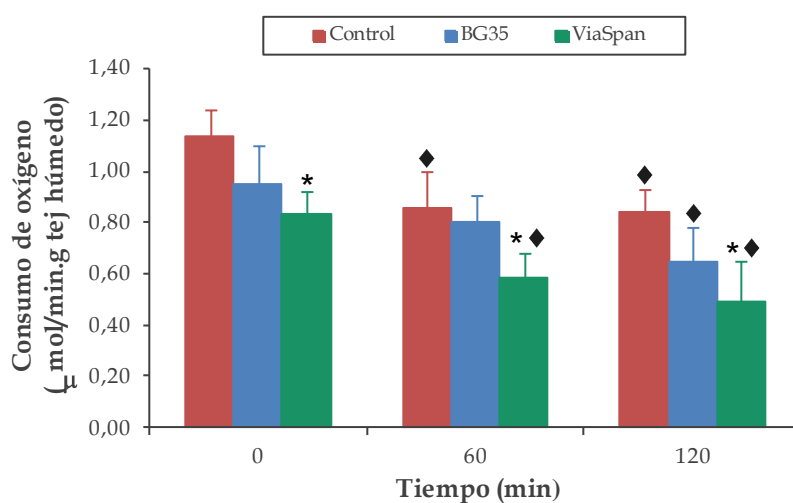
#### 4.1.2.3. EVOLUCIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE MOHs CONTROLES Y PRESERVADOS 48 H DURANTE LA REOXIGENACIÓN NORMOTÉRMICA

Las alteraciones que sufre el tejido en hipotermia pueden afectar no sólo la viabilidad sino también la funcionalidad del mismo durante el período de reoxigenación normotérmica. Por ello, luego de 48 h de preservación por isquemia fría, se analizaron diferentes parámetros funcionales en MOHs preservados al ser incubados nuevamente en un medio fisiológico (a 37 °C y en presencia de oxígeno).

##### 4.1.2.3.1. Determinación del consumo de oxígeno

La determinación del consumo de oxígeno durante la reoxigenación normotérmica es un test metabólico muy específico que permite evaluar posibles daños latentes en el tejido. En la Figura 11 se muestra el consumo de oxígeno de MOHs controles y preservados 48 h en las soluciones BG 35 y ViaSpan®, durante dicha etapa.

Los MOHs que fueron preservados en solución ViaSpan® presentaron un consumo de oxígeno significativamente menor que el grupo control a todos los tiempos de reoxigenación estudiados (**Controles:**  $1,13 \pm 0,11$ ,  $0,85 \pm 0,15$  y  $0,84 \pm 0,09$ , y **ViaSpan®:**  $0,83 \pm 0,09$ ,  $0,59 \pm 0,09$  y  $0,49 \pm 0,16$   $\mu\text{mol}$  de oxígeno/min.g de tejido húmedo, a los tiempos 0, 60 y 120 min, respectivamente,  $p < 0,05$ ).



**Figura 11:** Evolución del Consumo de oxígeno ( $\mu\text{mol}/\text{min.g}$  tejido húmedo) para MOHs control y MOHs preservados 48 h en las soluciones BG35 y ViaSpan®, durante el período de reoxigenación normotérmica. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

\* diferente del grupo control,  $p < 0,05$ ; ♦ diferente del tiempo 0,  $p < 0,05$

A su vez, el consumo de oxígeno luego de 60 y 120 minutos de reoxigenación, para los grupos control y ViaSpan®, fue significativamente menor que el mostrado al inicio de la reoxigenación. Para el grupo BG35, recién luego de 2 horas de exposición a condiciones de temperatura y oxigenación normales se observó una disminución significativa en el consumo de oxígeno respecto al tiempo 0 ( $0,95 \pm 0,15$  y  $0,65 \pm 0,13$   $\mu\text{mol}$  de oxígeno/min.g de tejido húmedo, a los tiempos 0 y 120 min, respectivamente,  $p < 0,05$ ).

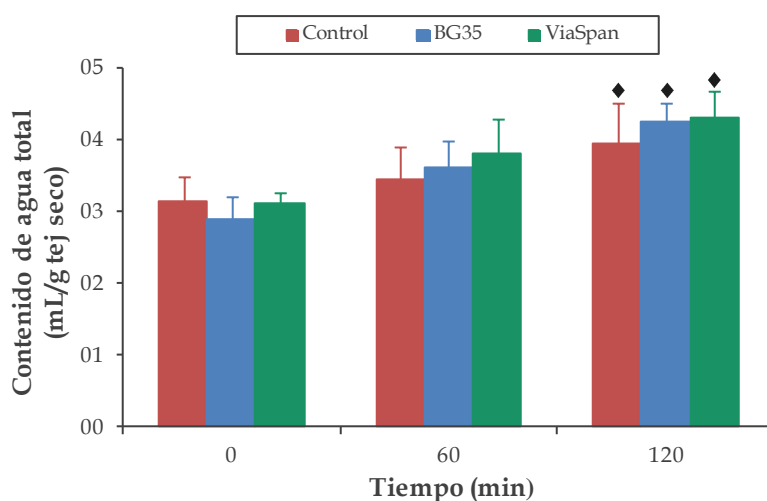
Los efectos de la isquemia fría sobre los procesos mitocondriales son altamente relevantes, dado que es esencial para la viabilidad celular que el estado energético sea mantenido durante el almacenamiento o restablecido durante la reoxigenación [125]. La función mitocondrial fue ensayada midiendo la actividad respiratoria de los MOHs. Durante toda la etapa de reoxigenación, el grupo BG35 mostró un consumo de oxígeno similar al grupo control. Estos resultados sugieren que los MOHs preservados en nuestra solución podrían tener un contenido más elevado de sustratos celulares y un menor deterioro de la integridad mitocondrial.

El PEG podría contribuir al mantenimiento de la integridad mitocondrial a través de su acción como soporte osmótico, ya que ejerce una presión oncótica que limita el edema, contribuyendo a prevenir la hinchazón mitocondrial que se produce durante la preservación hipotérmica. Por otro lado, el PEG también ha mostrado ser capaz de evitar la elevación en los niveles de ROS y de peroxidación lipídica en células y tejidos sometidos a diferentes tipos de injuria [57]. Se sabe que la mitocondria constituye uno de los blancos principales de los efectos adversos del estrés oxidativo, por lo que el PEG podría también ejercer un efecto protector en este aspecto. Cabe aclarar que pruebas *in vitro* usando sistemas libres de células han demostrado que el PEG no tiene la habilidad para eliminar directamente el anión superóxido o inhibir enzimas involucradas en la formación de ROS. Por ello, resulta más probable que el PEG reduzca el estrés oxidativo principalmente a través de la preservación o restauración de la integridad de membranas, lo que podría disminuir la producción de ROS durante la reoxigenación [57].

#### 4.1.2.3.2. Determinación del contenido de agua total

En la Figura 12 se muestra la evolución en el contenido de agua total, durante la reoxigenación normotérmica, para MOHs controles y preservados 48 h en las soluciones BG35 y ViaSpan®.

A los distintos tiempos, no existen diferencias significativas entre grupos aunque es importante destacar que, para todos los grupos analizados, el contenido de agua total aumenta con el tiempo, alcanzándose luego de 120 minutos valores significativamente mayores que al inicio de la reoxigenación (Figura 12). El contenido de agua total (mL/g tejido seco), luego de 2 h de reoxigenación, fue de  $4,0 \pm 0,6$  para los controles;  $4,2 \pm 0,3$  para BG35, y  $4,3 \pm 0,4$  para ViaSpan®.



**Figura 12:** Evolución del Contenido de agua total (mL/g tejido seco) para MOHs control y MOHs preservados 48 h en las soluciones BG35 y ViaSpan®, durante el período de reoxigenación normotérmica. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

♦ diferente del tiempo 0,  $p < 0,05$

Estos resultados indican que los MOHs preservados son capaces de regular su contenido de agua del mismo modo que los MOHs frescos, no observándose efectos nocivos de la preservación hipotérmica sobre este parámetro.

#### 4.1.2.3.3. Estudios sobre el metabolismo del amonio

Como ya fuera mencionado, el amonio se acumula en la sangre de pacientes con falla hepática, causando numerosos disturbios metabólicos y neurológicos. Por lo tanto, cualquier célula o tejido que vaya a ser empleado como componente biológico de un HBA debe llevar a cabo la tarea de detoxificar este metabolito [126]. La vía metabólica responsable de la remoción de amonio es el Ciclo de la

Urea, en el que las enzimas Carbamil Fosfato Sintetasa I (CPSI) y Ornitina Transcarbamilasa (OTC) catalizan el primer y segundo paso, respectivamente [64].

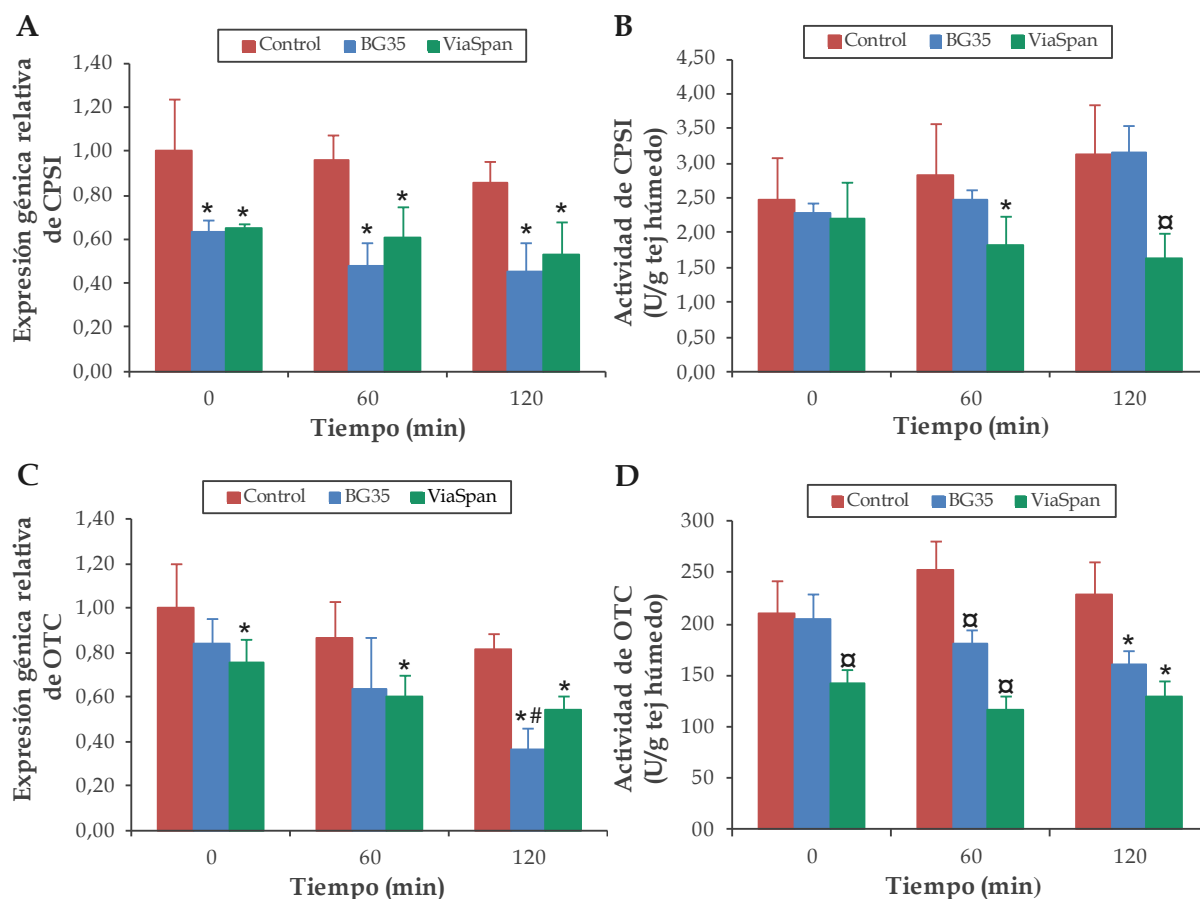
Para que sea posible usar MOHs preservados en un sistema de HBA, es importante estudiar sus respuestas genéticas a las bajas temperaturas y cómo estas podrían afectar su uso clínico. Principalmente, en el desarrollo de este trabajo de tesis, resultó fundamental estudiar la expresión génica y la actividad de las dos enzimas claves en la remoción del amonio, CPSI y OTC, junto con la habilidad de MOHs para detoxificar una sobrecarga de amonio *in vitro*.

Por todo esto, se evaluó en profundidad el metabolismo de amonio de MOHs controles y preservados 48 h en las soluciones BG35 y ViaSpan®, en el sistema de reoxigenación normotérmica, previo a su uso en nuestro modelo de HBA.

Los resultados obtenidos en el análisis de la expresión génica y la actividad enzimática de las dos principales enzimas del Ciclo de la Urea, Carbamil Fosfato Sintetasa I (CPSI) y Ornitina Transcarbamilasa (OTC), se muestran en la Figura 13.

Ambos grupos preservados enfrentan el inicio del período de reoxigenación con niveles de expresión relativa de CPSI menores que el grupo control y esta diferencia estadística se mantiene durante toda esta etapa (**Controles:**  $1,00 \pm 0,24$ ;  $0,96 \pm 0,12$  y  $0,86 \pm 0,10$ ; **BG35:**  $0,63 \pm 0,06$ ;  $0,48 \pm 0,11$  y  $0,45 \pm 0,14$ , y **ViaSpan®:**  $0,65 \pm 0,01$ ;  $0,61 \pm 0,14$  y  $0,53 \pm 0,15$ ,  $p < 0,05$ ). Cabe resaltar que, para todos los grupos estudiados, los niveles del transcripto de CPSI se mantuvieron constantes al incrementarse el tiempo de reoxigenación (Figura 13 A).

A pesar de las diferencias encontradas en los niveles del transcripto, todos los grupos presentaron actividades de CPSI similares al inicio de la reoxigenación. Sin embargo, luego de 60 minutos, los MOHs preservados en ViaSpan® mostraron una actividad enzimática menor que los controles ( $1,82 \pm 0,44$  vs  $2,82 \pm 0,76$  U/g de tejido húmedo, respectivamente,  $p < 0,05$ ). Al finalizar este período (120 minutos), el nivel de actividad de CPSI para el grupo ViaSpan® no sólo fue estadísticamente menor al del grupo control sino también respecto al grupo BG35 (**Controles:**  $3,12 \pm 0,73$ ; **BG35:**  $3,16 \pm 0,38$  y **ViaSpan®:**  $1,64 \pm 0,35$  U/g de tejido húmedo,  $p < 0,05$ , ver Figura 13 B).



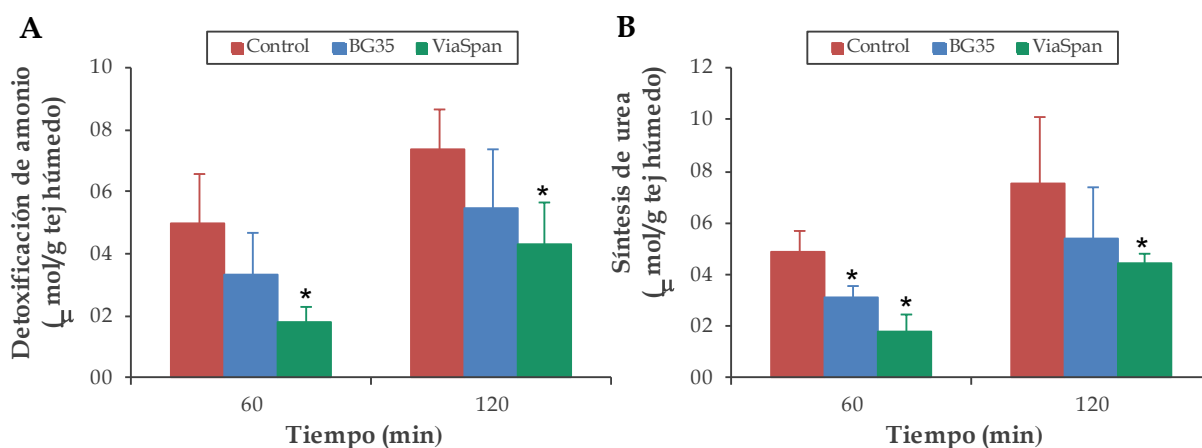
**Figura 13:** Evolución de: A) Expresión génica relativa de CPSI; B) Actividad de CPSI (U/g de tejido húmedo); C) Expresión génica relativa de OTC y D) Actividad de OTC (U/g de tejido húmedo), para MOHs control y MOHs preservados 48 h en las soluciones BG35 y ViaSpan®, durante el período de reoxigenación normotérmica. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SD, n = 3. \* diferente del grupo control, p < 0,05; α diferente de los demás grupos, p < 0,05; # diferente de los demás tiempos, p < 0,05.

Como puede verse en la Figura 13 C, sólo los MOHs preservados en la solución ViaSpan® mostraron niveles de expresión génica relativa para OTC menores que los encontrados para MOHs frescos a todos los tiempos analizados (**Controles:**  $1,00 \pm 0,20$ ;  $0,87 \pm 0,16$  y  $0,82 \pm 0,07$  y **ViaSpan®:**  $0,76 \pm 0,10$ ;  $0,60 \pm 0,10$  y  $0,54 \pm 0,07$ , p < 0,05). En lo que respecta al grupo BG35, luego de 120 minutos de reoxigenación, el nivel del transcripto de OTC mostró una disminución significativa, en comparación con los niveles encontrados a los tiempos 0 y 60 minutos ( $0,36 \pm 0,10$  vs  $0,84 \pm 0,12$  y  $0,64 \pm 0,23$ , respectivamente, p < 0,05), alcanzando un valor estadísticamente diferente al del grupo control (p < 0,05, ver Figura 13 C).

La actividad enzimática de OTC mostró un comportamiento similar al descrito anteriormente para el nivel de su transcripto. El grupo ViaSpan®

comenzó el período de reoxigenación con una actividad inferior a los grupos control y BG35 ( $141,5 \pm 13,9$  contra  $209,7 \pm 33,2$  y  $204,5 \pm 25,1$  U/g de tejido húmedo, respectivamente,  $p < 0,05$ ). Luego de la primera hora de reoxigenación, las actividades de todos los grupos fueron diferentes entre si (**Controles:**  $251,8 \pm 29,4$ ; **BG35:**  $180,3 \pm 14,4$ , y **ViaSpan®:**  $115,4 \pm 14,0$  U/g de tejido húmedo,  $p < 0,05$ ). Al finalizar la etapa de reoxigenación, ambos grupos preservados tuvieron un nivel de actividad para OTC significativamente menor al de MOHs frescos (**Controles:**  $228,8 \pm 32,8$ ; **BG35:**  $159,7 \pm 14,9$ , y **ViaSpan®:**  $128,5 \pm 15,8$  U/g de tejido húmedo,  $p < 0,05$ , ver Figura 13 D).

La capacidad que presentan MOHs controles y preservados para detoxificar una sobrecarga inicial de amonio se muestra en la Figura 14 A. Los MOHs preservados en BG35 tuvieron un comportamiento similar a los controles, mientras que el grupo ViaSpan® demostró poseer una capacidad significativamente disminuida respecto al grupo control durante todo el período de reoxigenación (**Controles:**  $5,0 \pm 1,6$  y  $7,4 \pm 1,3$  y **ViaSpan®:**  $1,8 \pm 0,5$  y  $4,3 \pm 1,4$   $\mu\text{mol/g}$  de tejido húmedo, a los 60 y 120 minutos, respectivamente,  $p < 0,05$ ).



**Figura 14:** Evolución de: A) **Detoxificación de amonio** y B) **Síntesis de urea**, para MOHs control y MOHs preservados 48 h en las soluciones BG35 y ViaSpan®, durante el período de reoxigenación normotérmica. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

\* diferente del grupo control,  $p < 0,05$

En lo que respecta a la síntesis de urea (Figura 14 B), luego de 60 minutos de reoxigenación, ambos grupos preservados mostraron una capacidad estadísticamente inferior para sintetizar este metabolito que el grupo control. Al final de la etapa de reoxigenación, el grupo BG35 fue capaz de revertir esta situación y mostró niveles de síntesis de urea similares al grupo control. Por su



parte, el grupo ViaSpan® no pudo alcanzar la performance de los controles (**Controles:**  $4,9 \pm 0,8$  y  $7,5 \pm 2,6$ ; **BG35:**  $3,1 \pm 0,5$  y  $5,4 \pm 2,0$ , y **ViaSpan®:**  $1,8 \pm 0,7$  y  $4,4 \pm 0,4$   $\mu\text{mol/g}$  de tejido húmedo, a los 60 y 120 min, respectivamente,  $p < 0,05$ ).

Luego de 48 h de almacenamiento en frío en BG35 y ViaSpan®, se evaluaron los niveles de ARNm y las actividades de CPSI y OTC en MOHs preservados, con el fin de determinar la existencia de posibles cambios respecto al grupo control y de una correlación entre estos parámetros y el metabolismo del amonio. Se encontró una mayor conservación de las actividades de ambas enzimas, durante la reoxigenación normotérmica, para MOHs preservados en solución BG35. A pesar de que el mecanismo no fue determinado, es posible que la reducción en los niveles del mensajero y en las actividades de las enzimas ensayadas se deba a su degradación durante el almacenamiento hipotérmico. Este proceso fue de algún modo prevenido en mayor medida en BG35 que en ViaSpan®. Específicamente, la actividad de CPSI, pero no su nivel de transcripto, y tanto los niveles de ARNm como de actividad de OTC fueron adecuadamente conservados en el grupo BG35 durante el período de reoxigenación (ver Figura 13).

Al estudiar la capacidad de detoxificación de amonio y de síntesis de urea (Figura 14), no se encontraron diferencias entre los grupos preservados. Sin embargo, sólo MOHs preservados en BG35 mostraron valores similares a los controles. En este punto, es importante recordar la interrelación existente entre estructura y función, y su fundamental importancia en el mantenimiento de la homeostasis celular. Los diferentes procesos bioquímicos, fisiológicos y biofísicos se encuentran compartamentalizados dentro de la célula, de tal manera que el mantenimiento de la estructura de las membranas biológicas se constituye en un componente integral tanto de la viabilidad como de la vitalidad celular [55]. Por esto, los efectos protectores del PEG sobre las membranas celulares pueden reflejarse, a su vez, en la mayor funcionalidad que muestran los MOHs preservados en BG35, en comparación con aquellos que fueron preservados en solución ViaSpan®.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que la solución de preservación BG35, desarrollada en nuestro laboratorio, permite que MOHs de

rata, almacenados 48 h en hipotermia, mantengan niveles de viabilidad y funcionalidad similares a los de MOHs frescos. Además, nuestras condiciones de preservación (48 h en solución BG35, anoxia, a 4 °C) no afectan el metabolismo de amonio, y los MOHs preservados mantienen las funciones fisiológicas y bioquímicas ensayadas, lo que permite su uso como componente biológico de un sistema de HBA.

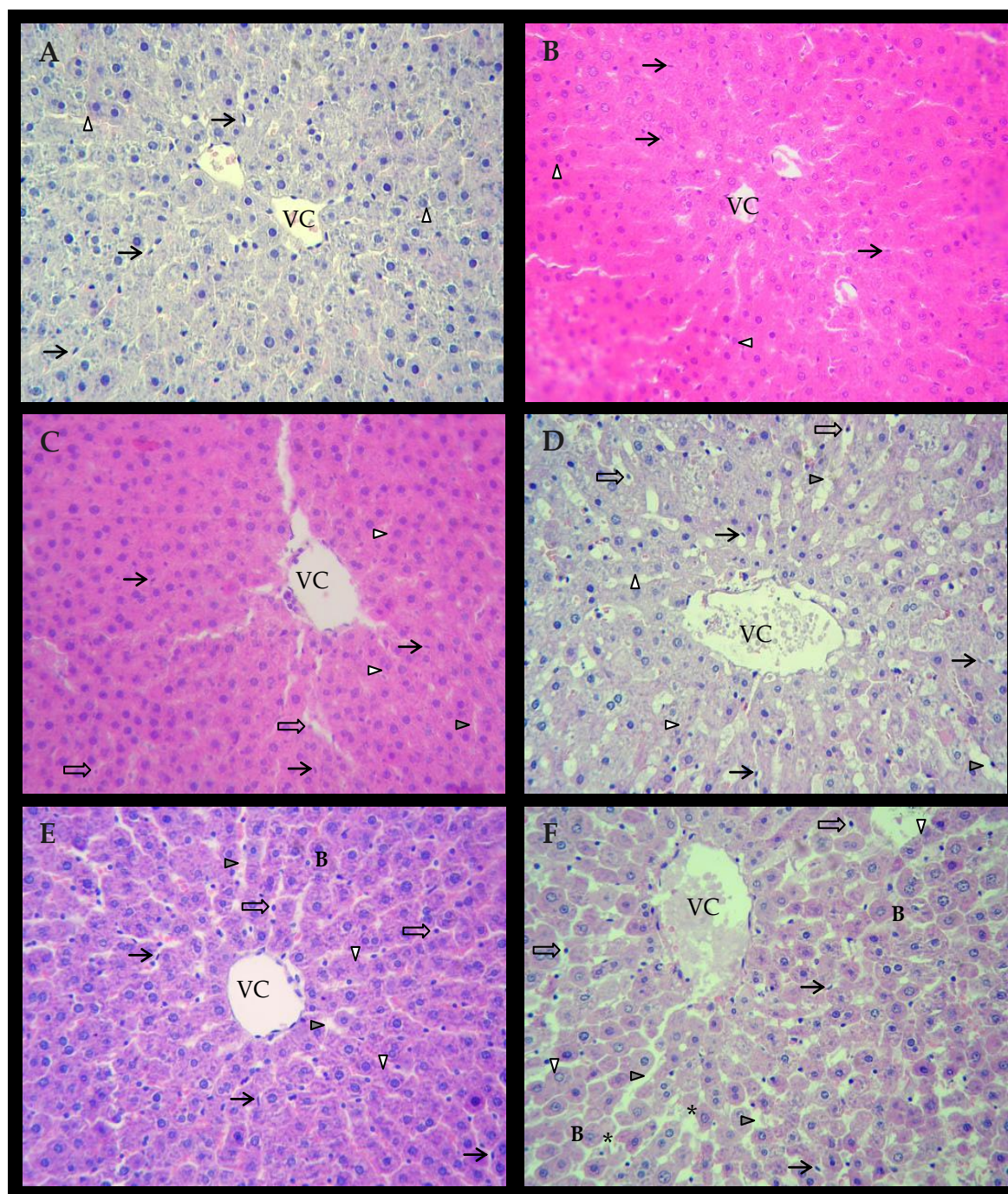
#### **4.1.2.4. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS DE MOHs CONTROLES Y PRESERVADOS 48 H DURANTE LA REOXIGENACIÓN NORMOTÉRMICA**

Se analizó la morfología de MOHs controles y MOHs preservados 48 h en las soluciones BG35 y ViaSpan®, al inicio y luego de 120 minutos de reoxigenación normotérmica. Los MOHs fueron fijados en formol al 10 % y procesados histológicamente hasta su inclusión en parafina. Se realizaron cortes de tejido de 5 µm, los que se colorearon con hematoxilina – eosina y se observaron con microscopía de campo claro utilizando un aumento de 200 X.

Los MOHs controles presentan morfología trabecular altamente conservada con células endoteliales normales, con su forma fusiforme característica, tanto al inicio como al final de la reoxigenación (Figuras 15 A y B, respectivamente).

Al inicio de la reoxigenación, los MOHs preservados en las soluciones BG35 y ViaSpan® (Figuras 15 C y E) muestran una morfología trabecular conservada con sinusoides levemente dilatados y células endoteliales de morfología mixta: fusiformes o redondeadas y adheridas a la matriz extracelular perisinusoidal, o redondeadas pero en el lumen sinusoidal. Los MOHs preservados en ViaSpan® también presentan hepatocitos balonizados a tiempo 0 (Figura 15 E).

Luego de 120 min de reoxigenación, ambos grupos preservados (Figuras 15 D y F) muestran morfología trabecular conservada con sinusoides muy dilatados y abundantes células endoteliales de forma redondeada. Además, los MOHs preservados en solución ViaSpan® (Figura 15 F) presentan la mayor parte de los hepatocitos balonizados y algunos blebs.



**Figura 15:** Hematoxilina-eosina de MOHs control y MOHs preservados 48 h, durante la reoxigenación normotérmica. Se tomaron muestras tanto al inicio ( $t=0$  min) como al final de la reoxigenación ( $t=120$  min). Magnificación: 200X; VC: vena central.

MOHs control: **A)**  $t = 0$  min. Se observa la morfología del parénquima hepático conservada, con células endoteliales de forma fusiforme y adheridas a la matriz extracelular (flechas negras), y cordones de hepatocitos sin alteraciones (triángulos blancos). **B)**  $t = 120$  min. Las características morfológicas del tejido hepático son iguales a las descritas en A.

MOHs preservados 48 h en BG35: **C)**  $t = 0$  min. Morfología trabecular conservada (triángulos blancos), células endoteliales de morfología mixta: fusiformes (flechas negras) y redondeadas (flechas anchas), y sinusoides levemente dilatados (triángulo gris). **D)**  $t = 120$  min. Se observan las mismas características morfológicas descritas en C.

MOHs preservados 48 h en ViaSpan®: **E)**  $t = 0$  min. Morfología trabecular conservada (triángulos blancos), células endoteliales de morfología mixta: fusiformes (flechas negras) y redondeadas (flechas anchas), sinusoides levemente dilatados (triángulo gris) y hepatocitos balonzados (B). **F)**  $t = 120$  min. Se observan todas las características morfológicas descritas en E, junto con la aparición de blebs (\*).

El mantenimiento de la integridad morfológica es uno de los indicadores más importantes de la integridad de los MOHs y resulta un buen parámetro para detectar injurias en las células [127]. Los MOHs preservados en las soluciones analizadas muestran una morfolología trabecular conservada alrededor de la vena central, con sinusoides dilatados y algunas células endoteliales redondeadas, que se vuelven abundantes al final de la reoxigenación. Los MOHs preservados en ViaSpan® constituyen el grupo que presenta un mayor deterioro de su morfolología al final de la reoxigenación. Además de los sinusoides dilatados y de las células endoteliales redondeadas, la mayoría de los hepatocitos están balonizados y presentan algunos blebs. Todos los daños observados en el tejido podrían ser adjudicados al proceso de preservación, ya que los MOHs controles presentan una morfolología normal tanto al inicio como al final de la reoxigenación.

#### **4.1.3. PROFUNDIZACIÓN EN EL ESTUDIO DE LA PRESERVACIÓN HIPOTÉRMICA DE MOHs EN SOLUCIÓN BG35: EVALUACIÓN DEL AGREGADO DE CORM-3**

Los gases medicinales antioxidantes, dentro de los que se encuentran el monóxido de carbono y el sulfuro de hidrógeno, son sustancias gaseosas de uso farmacéutico cuya utilización en la preservación hipotérmica de órganos y tejidos es relativamente reciente. Su efecto antioxidante lo ejercerían al limitar la producción de especies reactivas del oxígeno durante los períodos tanto de isquemia fría como de reoxigenación y regreso a normotermia [59].

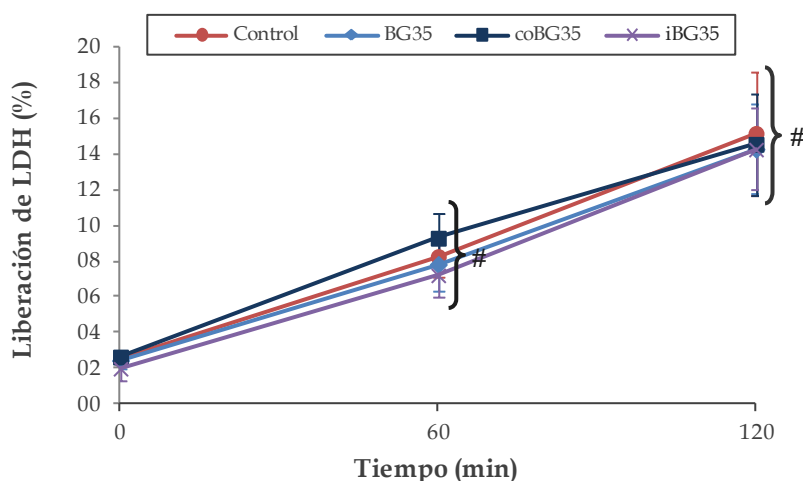
Estos gases medicinales pueden tener efectos beneficiosos o perjudiciales, dependiendo de la concentración a la que son utilizados, por lo que resulta necesario controlar de manera precisa esta variable. En el caso del monóxido de carbono, esto se consigue a través del uso de las llamadas moléculas liberadoras de CO [60].

Durante este trabajo de tesis, se estudiaron los posibles efectos protectores del agregado de un nuevo compuesto dador de CO, denominado CORM-3, a la solución de preservación de MOHs desarrollada en nuestro laboratorio, BG35.

Luego del período de almacenamiento en frío, se evaluaron parámetros de viabilidad y funcionalidad de MOHs controles y preservados en solución BG35 sola, o con el agregado de CORM-3, ya sea activo o inactivo, en el sistema de reoxigenación normotérmica.

#### 4.1.3.1. EVOLUCIÓN DE LA LIBERACIÓN DE LDH

La viabilidad de MOHs controles y preservados, durante el período de reoxigenación normotérmica, fue evaluada midiendo la cantidad de enzima LDH liberada al medio. Los resultados de este ensayo se muestran en la Figura 16. Nuevamente, todos los grupos analizados muestran un aumento en la liberación de esta enzima citosólica a medida que aumenta el tiempo de reoxigenación. A su vez, todos los grupos preservados muestran un comportamiento similar al de MOHs frescos.



**Figura 16:** Evolución de la Liberación de LDH (%) para MOHs control y MOHs preservados 48 h en la solución BG35 sola, y con el agregado de CORM-3 activo o inactivo, durante el período de reoxigenación normotérmica. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SD,  $n = 3$ . # diferente de los demás tiempos,  $p < 0,05$ .

Los valores de liberación de LDH (%), alcanzados luego de 2 horas de reoxigenación, fueron los siguientes:  $15,2 \pm 3,4$  para los controles;  $14,3 \pm 2,5$  para MOHs preservados en BG35 sola;  $14,6 \pm 2,8$  para los preservados en BG35 con el agregado de CORM-3 activo (grupo coBG35), y  $14,3 \pm 2,3$  para los MOHs preservados en BG35 más el compuesto inactivo (grupo iBG35).

El hecho de que todos los grupos preservados se comporten de manera similar entre si y con respecto al grupo control podría atribuirse a la capacidad ya mencionada del PEG para adherirse sobre las membranas celulares, formando una



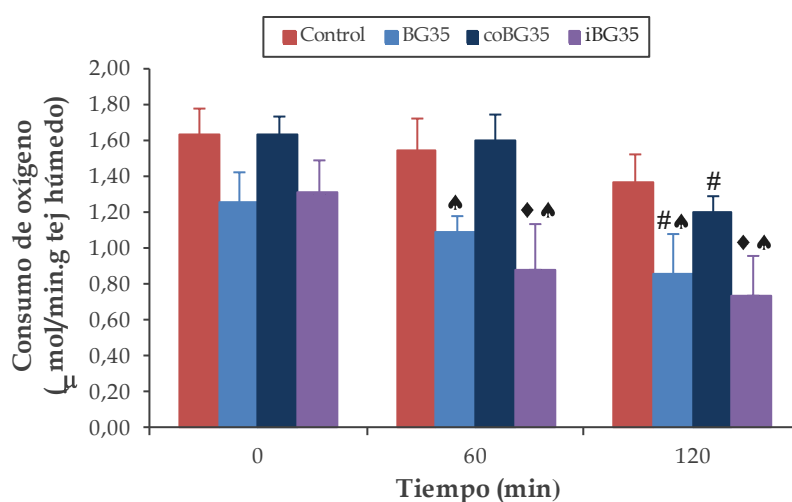
capa protectora [57]. Este efecto del PEG sobre la integridad de las membranas superaría los efectos positivos que pudiera ejercer el CO liberado a partir de CORM-3, ya que el grupo coBG35 presenta niveles de liberación de LDH similares al grupo BG35.

Por otro lado, los MOHs preservados en BG35 con el agregado del compuesto CORM-3 inactivo muestran el mismo comportamiento que los demás grupos, en lo que respecta a liberación de la enzima LDH. Esto permite descartar la existencia de efectos nocivos del rutenio sobre las membranas celulares en el tejido hepático.

#### 4.1.3.2. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE OXÍGENO

Para evaluar los efectos del agregado de CORM-3 a la solución BG35, sobre la capacidad metabólica de MOHs, uno de los ensayos utilizados fue la determinación del consumo de oxígeno.

Como puede observarse en la Figura 17, el grupo coBG35 mantiene, durante todo el período de reoxigenación, valores de consumo de oxígeno similares a los mostrados por MOHs control, a pesar de que a los 120 min se observa una disminución significativa de este parámetro con respecto a los demás tiempos.



**Figura 17:** Evolución del Consumo de oxígeno ( $\mu\text{mol}/\text{min.g}$  tejido húmedo) para MOHs control y MOHs preservados 48 h en la solución BG35 sola, y con el agregado de CORM-3 activo o inactivo, durante el período de reoxigenación normotérmica. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SD,  $n = 3$ . ♠ diferente de los grupos control y coBG35, ♦ diferente del tiempo 0, # diferente de los demás tiempos,  $p < 0,05$ .

Para MOHs preservados en BG35 sola o con el agregado de CORM-3 inactivo también se observa una disminución en el consumo de oxígeno con el tiempo. Además, tanto a los 60 como a los 120 min de reoxigenación, los índices mostrados por estos dos grupos son estadísticamente inferiores a los de MOHs control y MOHs preservados en BG35 con agregado del compuesto activo.

Los valores de consumo de oxígeno, expresados en  $\mu\text{mol}/\text{min.g}$  de tejido húmedo, mostrados luego de 2 horas de reoxigenación normotérmica, fueron de  $1,37 \pm 0,16$  para el grupo control;  $0,86 \pm 0,22^{\blacktriangle}$  para BG35;  $1,20 \pm 0,09$  para coBG35, y  $0,74 \pm 0,22^{\blacktriangle}$  para iBG35 ( $\blacktriangle$  indica diferencia significativa con los grupos Control y coBG35,  $p < 0,05$ ,  $n = 3$ ).

En la Figura 17 puede apreciarse un claro efecto protector del CORM-3 agregado a la solución de preservación de MOHs sobre el consumo de oxígeno, ya que el grupo coBG35 no sólo muestra valores similares al control durante todo el período de reoxigenación, sino que también estos valores son significativamente superiores a los presentados por los otros dos grupos preservados. Estos resultados pueden atribuirse al CO liberado a partir de CORM-3.

A partir de estudios realizados en otros tejidos [61,128], se sabe que el CO liberado a partir de CORM-3 puede tener profundos efectos protectores sobre la integridad y funcionalidad de las mitocondrias. Dentro de los mecanismos propuestos para explicar este efecto protector, CO se uniría al grupo hemo de la Citocromo C Oxidasa mitocondrial, con lo que reduciría sustancialmente la producción de ROS en la mitocondria, disminuyendo la lipoperoxidación y el daño a las membranas. Además, esta inhibición en la producción mitocondrial de ROS podría provocar la generación de bajos niveles de estas especies reactivas del oxígeno, lo que desencadenaría una respuesta adaptativa y la consiguiente supervivencia celular. Nuestros resultados demuestran que estos efectos del CO también se hacen evidentes en la protección del tejido hepático contra los daños causados por isquemia fría y posterior reoxigenación.

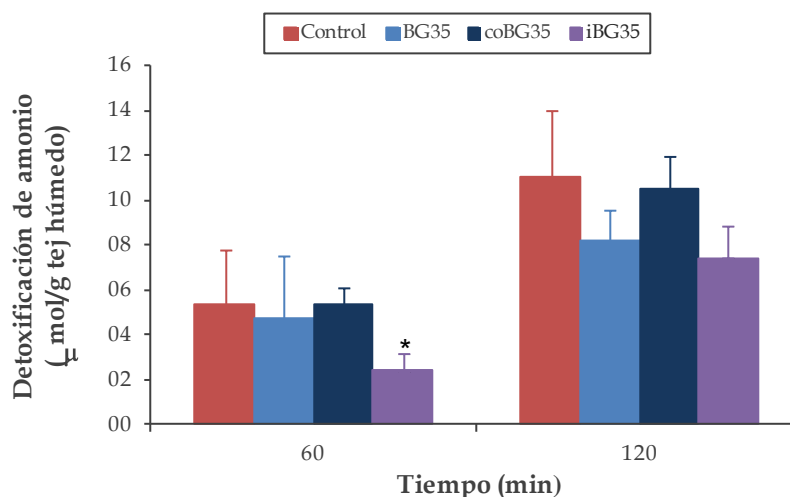
A diferencia de lo observado para la liberación de LDH, en este caso, prevalece el efecto antioxidante directo del CO sobre las mitocondrias, por encima del efecto indirecto protector de membranas del PEG ya mencionado.

#### 4.1.3.3. ANÁLISIS SOBRE LA DETOXIFICACIÓN DE AMONIO

La influencia del agregado de CORM-3 sobre la capacidad metabólica de MOHs también fue evaluada analizando los niveles de detoxificación de amonio. Este test es de fundamental relevancia, ya que, en nuestro caso, el desarrollo de un método óptimo para la preservación de MOHs tiene como fin último el uso de los mismos como componente biológico de un HBA.

En la Figura 18 se muestran los resultados obtenidos para la detoxificación de amonio por MOHs control y preservados. Sólo el grupo iBG35 muestra una capacidad para detoxificar amonio significativamente inferior al Control, luego de 60 min de reoxigenación. Sin embargo, esta situación es revertida a los 120 min, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos estudiados.

Los valores de detoxificación de amonio alcanzados al finalizar el período de reoxigenación fueron: **Control:**  $11,0 \pm 3,0$ ; **BG35:**  $8,2 \pm 1,5$ ; **coBG35:**  $10,5 \pm 1,4$ , e **iBG35:**  $7,4 \pm 1,5$   $\mu\text{moles de NH}_4^+$  detoxificados/g de tejido húmedo ( $n = 3$ ).



**Figura 18:** Evolución de la Detoxificación de amonio ( $\mu\text{mol/g}$  de tejido húmedo), para MOHs control y MOHs preservados 48 h en la solución BG35 sola, o con el agregado de CORM-3 activo o inactivo, durante el período de reoxigenación normotérmica. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

\* diferente del grupo control,  $p < 0,05$

Los resultados obtenidos no muestran un efecto beneficioso del agregado de CORM-3 a la solución BG35 sobre la capacidad de detoxificación de amonio, ya que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos preservados.



En una línea experimental paralela a este trabajo de tesis, con el fin de determinar los efectos sobre la vasculatura hepática del agregado de CORM-3 a las soluciones de preservación, se evaluaron diferentes parámetros de viabilidad y funcionalidad en hígados de rata preservados 48 h en hipotermia y luego sometidos a reperfusión en el modelo *ex vivo* de hígado aislado y perfundido normotérmicamente [129].

En este estudio, el parámetro de viabilidad seleccionado también fue la liberación de LDH durante la reperfusión, que sirve como marcador de injuria celular. Los hígados preservados en presencia de CORM-3 mostraron una liberación de LDH similar a los hígados control durante todo el período de reperfusión, mientras que aquellos preservados en ausencia del mismo o con el agregado del compuesto inactivo mostraron niveles estadísticamente superiores al grupo control. Esto demuestra que la presencia de CORM-3 durante el período de almacenamiento en frío ejerce un marcado efecto protector contra este daño por reperfusión [129].

Los parámetros de funcionalidad ensayados mostraron resultados similares a los expuestos para la liberación de LDH. Se observó una diferencia clara en la fisiología vascular hepática entre los diferentes grupos analizados. El agregado de CORM-3 a la solución de preservación produjo un aumento notable en el Flujo de Perfusión y una disminución considerable en la Resistencia Intrahepática con respecto a los demás grupos preservados. Durante la reperfusión normotérmica, el grupo preservado en presencia de CORM-3 no sólo mostró una normalización de los parámetros de perfusión hepática, causada por las propiedades vasoactivas del CO liberado, sino que también evidenció niveles de consumo de oxígeno similares a los de hígados control, debido a un efecto citoprotector de esta sustancia. Por el contrario, hígados preservados en ausencia de CORM-3 o con el agregado del compuesto inactivo presentaron valores de consumo de oxígeno estadísticamente disminuidos respecto al grupo control [129].

Durante este trabajo, también se analizó la capacidad de los hígados de sintetizar urea durante la reperfusión normotérmica (resultados no publicados). Los resultados mostraron que el agregado de CORM-3 a la solución de

preservación de hígados mejora los niveles de síntesis de urea, ya que el grupo preservado en presencia de este compuesto presentó valores estadísticamente superiores a los demás grupos preservados durante todo el período de reperusión. Sin embargo, este incremento no fue suficiente como para alcanzar los niveles de producción de urea mostrados por los hígados controles. Los valores encontrados luego de 90 minutos, expresados en  $\mu\text{mol}$  de urea/g de hígado, fueron:  $8,3 \pm 2,1$  para controles;  $3,1 \pm 0,5^\Delta$  para el grupo preservado en ausencia de CORM-3;  $5,1 \pm 0,8^*$  para el grupo CORM-3, y  $2,7 \pm 0,5^\Delta$  para el grupo iCORM-3 ( $^\Delta$  indica diferencia significativa con los grupos Control y coUWm y  $^*$  indica diferencia significativa respecto al grupo control,  $p < 0,05$  y  $n = 3$  para todos los grupos evaluados, resultados no publicados).

Todos los resultados expuestos sobre nuestro trabajo en el modelo *ex vivo* de hígado aislado y perfundido demuestran un claro efecto protector de CORM-3 contra los daños por isquemia fría y posterior reperusión/reoxigenación [129]. Esto concuerda con lo reportado para hígados preservados en presencia de CO gaseoso [130]. A su vez, efectos similares del agregado de CORM-3 a las soluciones de preservación fueron observados en riñón y corazón [61,62].

En el caso del uso de CORM-3 durante la preservación de MOHs, el efecto protector no fue tan determinante como el observado para la preservación de hígados enteros. Se observó un aumento en el consumo de oxígeno por parte de MOHs preservados en presencia de CORM-3, que mostraron valores superiores a los demás grupos preservados y similares al grupo control, luego de 60 y 120 min de reoxigenación. Esta influencia del agregado de CORM-3 sobre los procesos mitocondriales podría deberse al efecto antioxidante propuesto para el CO, descrito anteriormente [59,61]. En cuanto a la liberación de LDH, todos los grupos preservados se comportaron de manera similar al control durante el período de reoxigenación normotérmica. Esto demuestra el efecto protector de membranas ejercido por el PEG [57], que excedería cualquier efecto que el CO pudiera ejercer sobre estas estructuras celulares.

La síntesis de urea es una función relevante y específica del hígado que también se vio mejorada por la presencia de CORM-3 en la solución de

preservación de hígados enteros, ya que los órganos preservados con esta sustancia mostraron índices significativamente superiores a los demás grupos preservados durante todo el período de reperfusión (resultados no publicados). Estos resultados impulsaron la evaluación de los efectos del agregado de CORM-3 sobre la preservación de MOHs, expuesta en esta sección, con el objetivo de encontrar las condiciones óptimas para que estos microórganos lleven a cabo el metabolismo del amonio.

Al evaluar la detoxificación de amonio por parte de MOHs frescos y preservados 48 h en hipotermia, en el SRN, no se observó una mejoría clara en este parámetro por la presencia de CORM-3 en la solución de preservación. Luego de 120 min de reoxigenación, todos los grupos preservados mostraron el mismo comportamiento entre si y con respecto al grupo control.

Por esta razón, decidimos no realizar estudios posteriores utilizando MOHs preservados en BG35 con el agregado de CORM-3 como componente biológico de nuestro modelo de HBA (los resultados de esta etapa se expondrán en el Capítulo III de Resultados y Discusión).

## 4.2. ESTUDIOS SOBRE EL DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL COMPONENTE ARTIFICIAL

Los hígados bioartificiales (HBA) son dispositivos de asistencia hepática extracorporeal que constan principalmente de un componente artificial o sintético y de un componente biológico. El componente sintético lo constituye normalmente un biorreactor cuya principal función es dar sustento al componente biológico alojado dentro de él. Se considera que el diseño ideal de un HBA debe asegurar un mantenimiento óptimo *ex vivo* del componente metabólicamente activo empleado, en lo que respecta a viabilidad y funcionalidad [73]. Para ello, el biorreactor debe permitir un adecuado intercambio de sustancias entre la sangre del paciente y el componente biológico, en especial de oxígeno y nutrientes, y de las toxinas que se deben eliminar.

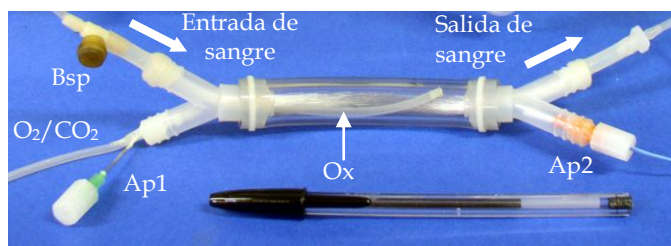
#### **4.2.1 DESCRIPCIÓN DE LA ARQUITECTURA Y PARÁMETROS FUNCIONALES DE LOS MINIBIORREACTORES UTILIZADOS**

El diseño de un biorreactor busca, fundamentalmente, mantener la viabilidad y funcionalidad celular por un período de tiempo razonable, de forma que los HBA se constituyan en una herramienta terapéutica efectiva [131]. Por esta razón, en nuestro laboratorio se han diseñado y modificado distintos prototipos de manera de adaptarlos a las necesidades del componente biológico que se quiere alojar en el minibiorreactor (MBR).

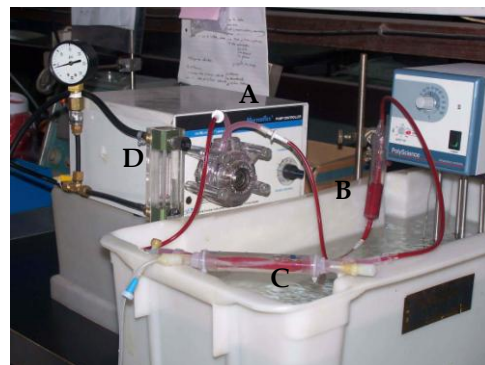
##### **4.2.1.1. PRIMER MBR DISEÑADO**

El sistema originalmente diseñado en nuestro laboratorio, con anterioridad al inicio de este trabajo de tesis, está constituido por un cartucho plástico cilíndrico, cerrado en ambos extremos por conectores en forma de Y que permiten el ensamblaje de las 140 fibras huecas utilizadas; de dos puertos de acceso al compartimiento celular y del tubo oxigenador de silicona. Los componentes de este MBR, ideado para el uso de suspensiones de hepatocitos como componente biológico, se detallan en la Figura 19. Los puertos de acceso permiten el llenado del compartimiento biológico, cuya capacidad es de unos 9 cm<sup>3</sup>, y la toma de muestras del fluido en este compartimiento. En la Figura 20, se muestra el sistema de perfusión utilizado, constituido por el reservorio para la sangre de carnero, el

MBR y la bomba peristáltica, que asegura un flujo de perfusión constante de 9 mL/min. El MBR y el reservorio para la sangre se mantienen inmersos en un baño termostatzado a 37 °C durante todo el experimento. También puede apreciarse en la figura el sistema utilizado para controlar la provisión externa de carbógeno y mantenerla constante en 85 mmHg.



**Figura 19:** Componentes del MBR: Ap 1 y 2: puertos de acceso al compartimiento biológico; Bsp: puerto de muestreo para la sangre; las flechas blancas señalan el ingreso y salida del flujo sanguíneo; O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>: línea de provisión de carbógeno; Ox: tubo oxigenador de silicona.



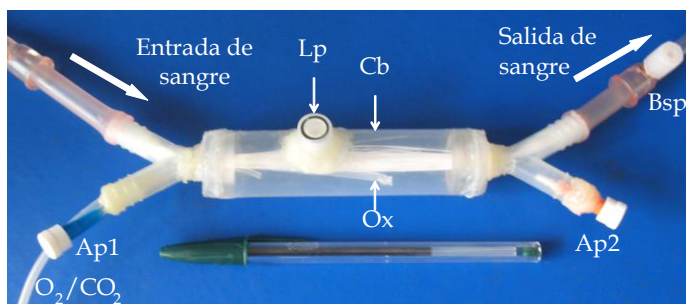
**Figura 20:** Elementos del sistema de perfusión: A) bomba peristáltica; B) reservorio para la sangre, y C) MBR. Se muestra además el dispositivo para controlar la provisión externa de carbógeno (D).

Este MBR tiene un diseño sencillo, que permite el correcto intercambio de sustancias entre los dos compartimientos, sin producir hemoconcentración de la sangre por diferencias osmóticas [114]. Las fibras utilizadas en la construcción de este primer MBR eran de un material polimérico comercialmente conocido como Cuprophane (Nikkiso Co. Ltda., Tokio, Japón). Dado que la fabricación de las mismas fue discontinuada, como parte de este trabajo de tesis, resultó importante evaluar el uso de diferentes tipos de fibras huecas disponibles comercialmente para encontrar aquellas cuyas características se adaptasen mejor a nuestro sistema, como se detalla más adelante en este capítulo.

#### 4.2.1.2. MODIFICACIONES INTRODUCIDAS AL DISEÑO ORIGINAL

En este trabajo de tesis se decidió evaluar el uso de los microórganos hepáticos (MOHs) como componente biológico de un HBA. Como se detalló en el capítulo anterior de resultados, los mismos mostraron tener una buena capacidad de detoxificación de amonio y síntesis de urea durante su reoxigenación en el sistema de reoxigenación normotérmica (SRN).

Para poder utilizar dichos MOHs en nuestro sistema de HBA se realizaron algunas adaptaciones al MBR descrito anteriormente. Estas modificaciones consistieron en el agregado de un puerto de carga de mayor tamaño, que permitiera introducir los cortes de tejido (Lp, ver Figura 21), y el aumento del volumen del compartimiento biológico (Cb) hasta los 45 cm<sup>3</sup>, para poder alojar la masa necesaria de MOHs. En la construcción de este MBR se utilizaron fibras de Polyamix™, obtenidas a partir de cartuchos de diálisis comercializados por la firma GAMBRO®.



**Figura 21:** MBR de mayor volumen, con puerto de carga (Lp) de mayor tamaño. Ap 1 y 2: puertos de acceso al compartimiento biológico; Bsp: puerto de muestreo para la sangre; las flechas blancas indican el ingreso y salida del flujo sanguíneo; O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>: línea de provisión de carbógeno; Ox: tubo oxigenador de silicona.

Con el fin de caracterizar el sistema se analizaron diferentes parámetros funcionales de este MBR en experimentos sin componente biológico. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 6 (n=3).

**TABLA 6:** Parámetros funcionales del MBR cilíndrico con un Cb de 45 cm<sup>3</sup>

Tiempo de perfusión	Osm <sub>Cs</sub> /Osm <sub>Cb</sub>	Hto (%)	Hemólisis (%)	[Glucosa] <sub>Cs</sub> / [Glucosa] <sub>Cb</sub>	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] <sub>Cs</sub> / [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] <sub>Cb</sub>	Q <sub>NH4+</sub> (μmoles)
0 min	0,95 ± 0,05	43 ± 3	0,12 ± 0,06	0,12 ± 0,01	23,2 ± 1,2	31,1 ± 3,9
60 min	0,99 ± 0,01	42 ± 6	0,30 ± 0,08	0,81 ± 0,03	1,4 ± 0,4	31,1 ± 4,2
120 min	1,00 ± 0,01	38 ± 2	0,65 ± 0,10	0,94 ± 0,02	1,2 ± 0,2	31,3 ± 3,8

Durante las 2 horas de perfusión no se observaron grandes cambios en los valores de hematocrito (Hto) y tampoco se apreciaron modificaciones en la relación entre las osmolalidades de los fluidos de ambos compartimientos (Osm<sub>Cs</sub>/Osm<sub>Cb</sub>), lo que indica que no se produjo concentración de la sangre de carnero que perfunde el sistema.

Los valores de hemólisis permiten apreciar que la sangre posee un cierto porcentaje de lisis inicial (t = 0 min) ocasionado durante la extracción y manipulación de la misma. Durante la perfusión, se produce un leve aumento en el grado de hemólisis, no llegando este parámetro a superar el 1 % luego de las dos

horas. El incremento observado en los niveles de hemólisis es mínimo y puede atribuirse al funcionamiento de la bomba peristáltica.

La relación de concentraciones para la glucosa fue aumentando con el tiempo de perfusión debido a la difusión de este metabolito hacia la sangre. La sobrecarga de amonio, adicionada inicialmente a la sangre, se equilibró rápidamente, debido a que este metabolito es capaz de difundir libremente hacia el compartimiento biológico. La masa total de amonio en el sistema ( $Q_{NH4+}$ ) se mantuvo constante durante los 120 minutos de perfusión, lo que demuestra que no existen pérdidas o interacciones inespecíficas de dicho compuesto con algún componente del MBR.

Cabe aclarar que la concentración de amonio en la sangre de pacientes con FHA puede ser superior a 0,2 mM y, además, debe considerarse que en ese caso existe una infusión continua de este metabolito al flujo sanguíneo. En nuestros experimentos *in vitro* utilizamos una concentración superior, de 1 mM, ya que trabajamos con el agregado de una única dosis inicial de amonio. A su vez, consideramos que si el componente biológico es capaz de mantener una buena viabilidad y funcionalidad ante una sobrecarga mayor, también podrá hacerlo frente a dosis menores. Calligaris y colaboradores demostraron que ni la viabilidad celular ni la capacidad de detoxificación de amonio de suspensiones de hepatocitos recién aislados se ven afectadas por la concentración de la sobrecarga inicial de amonio [132].

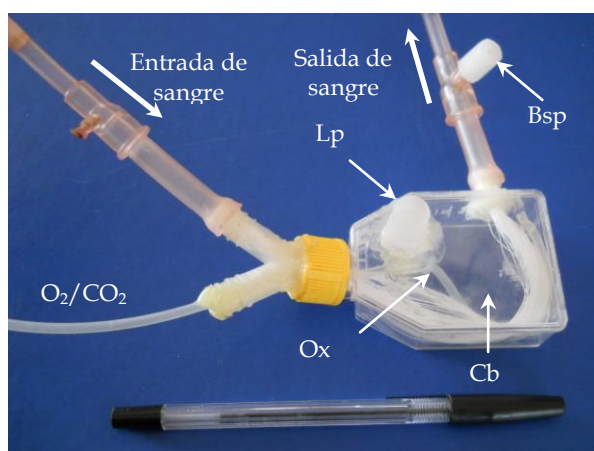
Todos estos resultados demuestran que el MBR cilíndrico desarrollado en nuestro laboratorio tiene un diseño simple y fácilmente adaptable a los incrementos de volumen, cuestión importante en el proceso final de escalado al que debe someterse este tipo de sistemas.

#### **4.2.1.3. MBR DE BASE PLANA**

Con el fin de optimizar la arquitectura del sistema al uso de MOHs planos como biocomponente se diseñó un MBR con un compartimiento biológico de base plana (Figura 22). El mismo se construyó utilizando un frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, al que se le adicionaron un puerto de carga en la parte superior (Lp en la Figura 22), un conector en forma de Y en la tapa y un conector simple en una de sus caras



laterales. Las 140 fibras huecas de Polyamix™ ingresan al sistema por uno de los brazos del conector en Y y lo abandonan a través del conector simple. El tubo oxigenador de silicona penetra en el compartimiento biológico a través del brazo libre del conector en forma de Y. La longitud del tubo oxigenador se mantuvo igual a la de los modelos anteriores, asegurando que la provisión de oxígeno por medio de esta vía no se vea modificada. El volumen del compartimiento biológico es similar al del prototipo anterior (unos 45 a 50 cm<sup>3</sup>), pero este nuevo modelo ofrece una superficie inferior plana capaz de permitir una mejor distribución de los MOHs.



**Figura 22:** MBR de base plana. Cb: compartimiento biológico; Lp: puerto de carga; O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>: línea de provisión de carbógeno; Ox: tubo oxigenador de silicona y Bsp: puerto de muestreo para la sangre.



**Figura 23:** Nuevo sistema de perfusión: A) bomba peristáltica; B) reservorio para la sangre, y C) MBR. Se muestra además el dispositivo para controlar la provisión externa de carbógeno (D).

También se modificó el sistema de perfusión, tal como se muestra en la Figura 23. En este nuevo sistema, el baño termostatzado fue reemplazado por un baño tipo Dubnoff que permite mantener la temperatura de la sangre y el MBR en 37 °C, y provee un buen nivel de agitación. Esto último favorece los procesos difusivos y de intercambio entre los MOHs y el medio, pudiendo mejorar la funcionalidad de los mismos.

Al igual que para los modelos anteriores, se determinaron distintos parámetros funcionales para este nuevo sistema en experimentos sin componente biológico. Los resultados se muestran en la Tabla 7 (n=3).

TABLA 7: Parámetros funcionales del nuevo MBR de base plana

Tiempo de perfusión	Osm <sub>Cs</sub> / Osm <sub>Cb</sub>	Hto (%)	Hemólisis (%)	[Glucosa] <sub>Cs</sub> / [Glucosa] <sub>Cb</sub>	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] <sub>Cs</sub> / [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] <sub>Cb</sub>	Q <sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></sub> (μmoles)
0 min	0,94 ± 0,02	47 ± 3	0,27 ± 0,09	0,09 ± 0,04	52,8 ± 4,0	36,3 ± 1,6
60 min	1,00 ± 0,02	44 ± 5	0,59 ± 0,10	0,77 ± 0,07	1,1 ± 0,1	36,1 ± 1,6
120 min	1,00 ± 0,01	45 ± 3	0,79 ± 0,12	0,90 ± 0,06	1,2 ± 0,3	36,1 ± 1,5

Las osmolalidades del plasma y de la solución KHA se igualaron en la primera hora de perfusión, lo que demuestra un adecuado intercambio de fluidos entre ambos compartimientos. El hematocrito no sufrió variaciones importantes, no observándose concentración de la sangre que perfunde el sistema. Nuevamente puede observarse que la sangre posee un cierto grado basal de hemólisis y que el pequeño porcentaje de hemólisis generado durante la perfusión puede ser atribuido a la acción de la bomba peristáltica.

Las concentraciones de amonio en ambos compartimientos se igualaron luego de la hora de funcionamiento y la masa total (Q) de este metabolito se mantuvo constante lo que indica que no se produjeron pérdidas o interacciones del mismo con algún componente del sistema. Un comportamiento similar se observó para la distribución de glucosa.

El cambio realizado en la arquitectura del sistema no provocó modificaciones en los parámetros funcionales medidos y el nuevo MBR de base plana mantuvo un intercambio de fluidos y metabolitos similar al de cuerpo cilíndrico.

#### **4.2.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS DISTINTAS FIBRAS UTILIZADAS**

Como ya se expuso previamente, resulta de fundamental importancia mantener un adecuado transporte de solutos entre los compartimientos sanguíneo y biológico, ya que dicho transporte afecta directamente la viabilidad y funcionalidad celular y, por lo tanto, el desempeño del biorreactor. Las características de la membrana de las fibras huecas utilizadas en la construcción del MBR son clave en esta cuestión, ya que:

- el tamaño de poro (valor de corte de PM) fija que solutos pueden difundir entre ambos compartimientos.
- el grosor de la membrana afecta la velocidad de los procesos difusivos.

#### 4.2.2.1. FIBRAS DE CELULOSA REGENERADA

Entre los primeros tipos de fibras desarrolladas para el uso en cartuchos de diálisis se encuentran aquellas que se obtienen a partir de la disolución de sustancias celulósicas en solventes adecuados y su posterior reprecipitación utilizando procesos de hilado húmedo o hilado en seco (con evaporación del correspondiente solvente). Las fibras obtenidas a partir de este proceso se conocen en conjunto como fibras de celulosa regenerada [133].

- *Fibras de cuprophane*: los primeros materiales utilizados para la construcción de las fibras huecas fueron el acetato de celulosa y el cuprophane. El cuprophane, hilado a partir de celulosa vía el proceso del cuproammonio usado para fibras textiles, dio lugar a las fibras huecas más fuertes y resistentes entre las disponibles hasta ese momento [134]. En nuestro caso, las fibras de cuprophane fueron obtenidas a partir de cartuchos de diálisis comercializados por la compañía Nikkiso Co. Ltda. (Tokio, Japón). Las mismas se utilizaron con éxito en la construcción del primer modelo diseñado en nuestro laboratorio; presentaban un diámetro interno de 210  $\mu\text{m}$  y su espesor de membrana era de 30  $\mu\text{m}$ . Dado que la fabricación de dichas fibras fue discontinuada con anterioridad al inicio de este trabajo de tesis, se evaluó el uso de diferentes tipos de fibras disponibles en el mercado.

- *Fibras de cuprammonium rayon*: Rayón es el nombre que se le da al conjunto de fibras obtenidas a partir de la celulosa. En el caso del cuprammonium rayon o rayon al cobre, la celulosa se disuelve en hidróxido de tetraamincobre (II) y, después del hilado en agua caliente, se estira la fibra y se elimina el cobre con ácido sulfúrico al 10% [133]. En realidad, las fibras de cuprammonium rayon constituyen una variante de las fibras originales de cuprofán [134]. Estas fibras se obtuvieron a partir de cartuchos de diálisis comercializados por la firma Asahi Medical Co. Ltd.. Al perfundir los MBR contruidos utilizando estas fibras se observó un gran aumento de presión en el sistema debido a que las mismas no permitían la circulación adecuada de la sangre. Se incrementó el número de fibras utilizadas en la construcción de los prototipos, desde 140 a 240, sin obtenerse mejores resultados. Se concluyó que el diámetro interno de las fibras de

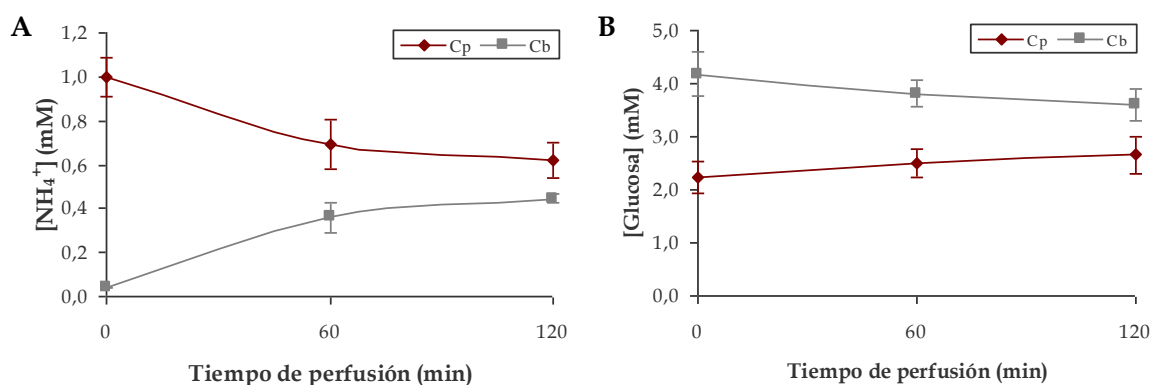
cuprammonium rayón (180  $\mu\text{m}$ ) era muy pequeño y no permitía un correcto flujo sanguíneo, por lo que se descartó su uso.

#### 4.2.2.2. FIBRAS DE POLISULFONA

El nombre polisulfona describe a una familia de polímeros termoplásticos, reconocidos por su resistencia y su estabilidad a altas temperaturas. Las polisulfonas más importantes son polímeros aromáticos amorfos, que se obtienen por condensación de diferentes tipos de cloruros de sulfonilo. Las polisulfonas pueden ser manipuladas para generar membranas con propiedades reproducibles y tamaño de poro controlable [135].

En nuestro sistema, se utilizaron fibras de polisulfona de alto flujo, provenientes de hemofiltros desarrollados por Medica S.R.L., que presentan un diámetro interno de 250  $\mu\text{m}$ , un espesor de pared de 50  $\mu\text{m}$  y un valor de peso molecular de corte de 50 kDa.

Estas fibras permitieron el flujo adecuado de la sangre a través del MBR y la distribución de una sobrecarga de amonio, administrada inicialmente al Cp, entre ambos compartimientos hasta alcanzar el equilibrio entre los 60 y los 120 minutos (Figura 24 A). La glucosa también fue capaz de atravesar libremente la membrana de estas fibras, moviéndose impulsada por una diferencia de concentración desde el compartimiento biológico hacia el sanguíneo (Figura 24 B). En estos experimentos se utilizó una concentración de glucosa de aproximadamente 5 mM, que fue luego incrementada hasta 25 mM, concentración utilizada para incubar MOHs en solución KH [136].



**Figura 24:** Evolución de las concentraciones (mM) de A) amonio y B) glucosa en los compartimientos sanguíneo y biológico (Cp y Cb, respectivamente) en MBR construidos con fibras de polisulfona (n=6).

El inconveniente observado en los experimentos realizados con MBR contruidos con estas fibras fue un aumento excesivo del hematocrito, que alcanzó el  $33,2 \pm 3,7$  % (n=6) luego de los 120 minutos de perfusión. La causa radicaría en que las mismas son usadas para hemoconcentración, lo que llevaría al pasaje de líquido desde la sangre al compartimiento biológico y a un aumento concomitante del hematocrito.

Por esta razón, a pesar de que las fibras de polisulfona permiten un adecuado flujo sanguíneo a través de todo el sistema de perfusión y un correcto intercambio de solutos y fluidos entre ambos compartimientos del MBR, decidimos discontinuar su uso.

#### **4.2.2.3. FIBRAS DE POLYAMIX™**

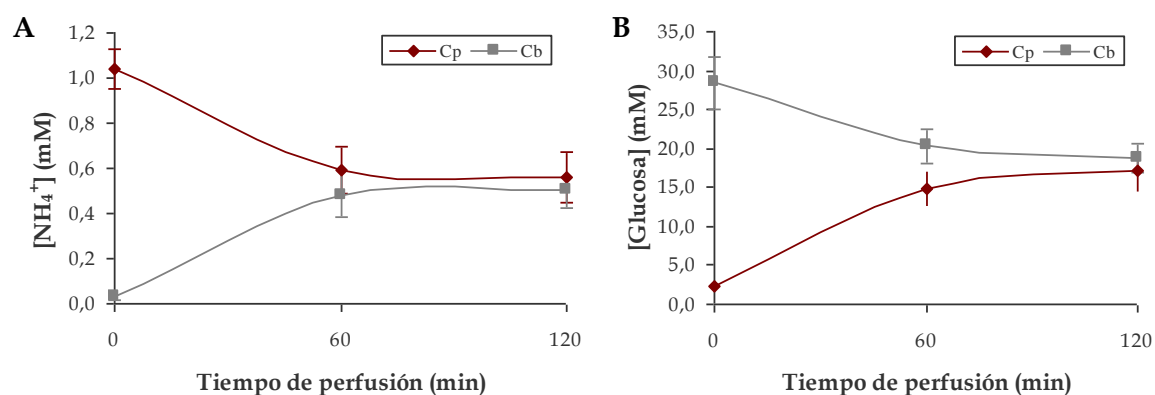
Dentro de los cartuchos de diálisis existentes en el mercado se pudo tener acceso a los comercializados por la firma GAMBRO®, que contienen fibras de un material polimérico denominado Polyamix™, constituido por una mezcla de poliariletersulfona, polivinilpirrolidona y poliamida.

Las fibras de Polyamix™ utilizadas en la construcción de nuestros MBR tienen un diámetro interno de 215  $\mu\text{m}$ , un espesor de pared de 50  $\mu\text{m}$  y un valor de peso molecular de corte de 50 kDa; las mismas permitieron mantener un buen flujo sanguíneo a través de todo el sistema de perfusión.

Al evaluar la distribución de una sobrecarga de amonio (Figura 25 A), observamos que las concentraciones en ambos compartimientos se equilibran luego de 60 minutos de perfusión. Estas fibras también permiten la libre difusión de la glucosa a favor de su gradiente de concentración, alcanzándose el equilibrio entre ambos compartimientos luego de la hora de funcionamiento (Figura 25 B).

Las membranas de Polyamix™ han sido desarrolladas especialmente para el uso en hemodiálisis de alto flujo, por lo que tienen una elevada capacidad de ultrafiltración. Los valores calculados para la Fracción de Filtración fueron de  $1,99 \pm 0,47$  % y  $2,01 \pm 0,51$  % para la primera y segunda hora de perfusión, respectivamente (n=6). Estos valores se encuentran alejados del valor crítico del 30

% [117], por lo que no existen riesgos de excesiva deshidratación de la sangre y taponamiento de las fibras.



**Figura 25:** Evolución de las concentraciones (mM) de A) amonio y B) glucosa en los compartimientos sanguíneo y biológico (C<sub>p</sub> y C<sub>b</sub>, respectivamente) en MBR construidos con fibras de Polyamix™ (n=6).

Los resultados anteriormente descritos demuestran que estas fibras permiten un adecuado transporte difusivo y convectivo. Además, los datos presentados en las Tablas 6 y 7 muestran que, en los experimentos realizados con las fibras de Polyamix™, no se observó hemoconcentración ni se produjeron pérdidas en la masa total de amonio ni interacciones de dicho catión con algún componente polimérico de la membrana. Por todo lo expuesto, podemos concluir que las fibras de Polyamix™ son adecuadas para la construcción de nuestros minibioreactores.

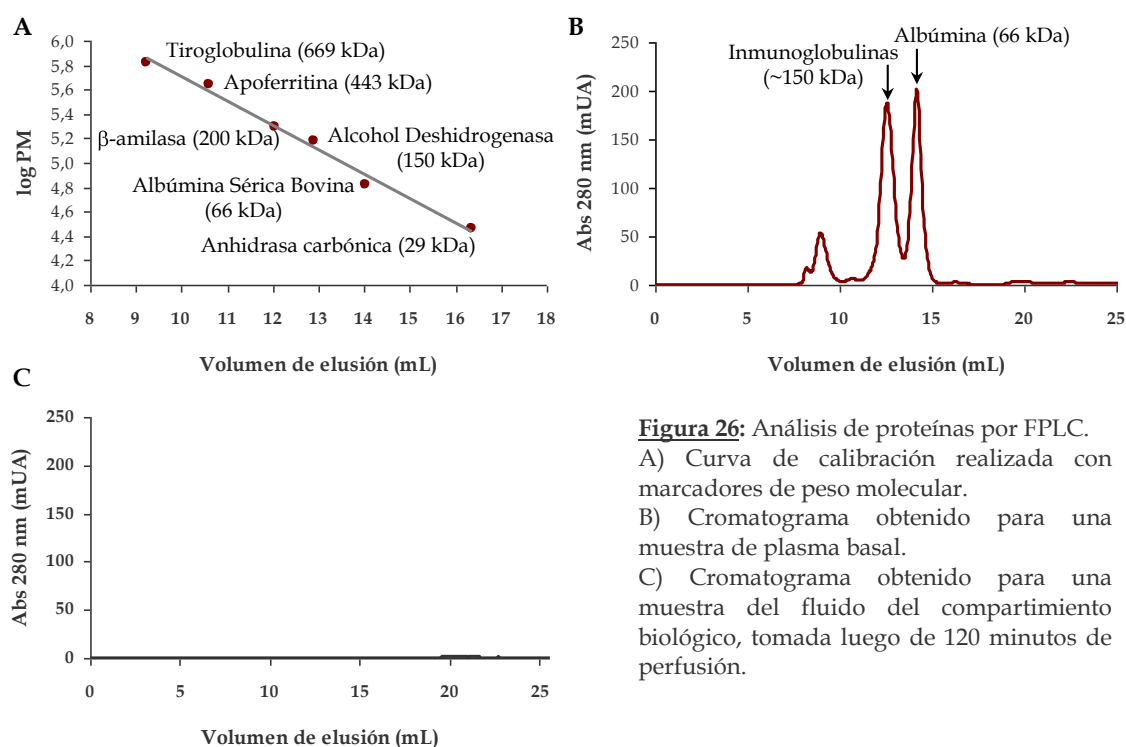
#### 4.2.2.4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR FPLC

Las características de las fibras huecas son las que regulan el intercambio bidireccional de sustancias entre los compartimientos sanguíneo y biológico. Los resultados descritos anteriormente muestran la libre difusión de pequeños metabolitos a través de la pared de las fibras empleadas en nuestros MBR. Con el fin de evaluar el comportamiento de las mismas frente a moléculas de mayor tamaño, se analizó su permeabilidad frente a las proteínas del plasma en experimentos sin componente biológico (ver Materiales y Métodos, página 76).

La técnica utilizada para este estudio fue la cromatografía de filtración en gel. En este método, las moléculas son separadas en base a su difusión a través de los

poros de la resina empacada dentro de la columna. Las proteínas de gran tamaño no son capaces de entrar en los poros, por lo que atraviesan la columna más rápidamente que las proteínas de menor tamaño, las cuales eluyen en función del peso molecular decreciente [137].

El cromatograma obtenido para la muestra de plasma basal analizada (Figura 26 B) permite observar la presencia de dos picos mayoritarios que, en base a la curva de calibración obtenida (Figura 26 A), pueden asignarse a las principales proteínas plasmáticas: la albúmina (volumen de elución ( $V_e$ ) = 14,15 mL) y las inmunoglobulinas (IgG mayoritariamente,  $V_e$  = 12,52 mL). Se aprecian también dos picos minoritarios que eluyen de forma temprana de la columna ( $V_e < 9$  mL) y corresponden a proteínas de alto peso molecular (PM > 700 kDa). Estos podrían deberse a la  $\alpha_2$ -macroglobulina (PM = 725 kDa,  $V_e$  = 8,92 mL) y a la forma pentamérica de la IgM (PM = 950 kDa,  $V_e$  = 8,22 mL) [1].



**Figura 26:** Análisis de proteínas por FPLC. A) Curva de calibración realizada con marcadores de peso molecular. B) Cromatograma obtenido para una muestra de plasma basal. C) Cromatograma obtenido para una muestra del fluido del compartimiento biológico, tomada luego de 120 minutos de perfusión.

En la Figura 26 C se muestra el cromatograma obtenido para una muestra del fluido del compartimiento biológico extraída luego de 120 minutos de perfusión sanguínea (el mismo resultado se obtuvo a los 60 minutos). Puede apreciarse que

ninguna de las proteínas del plasma fue capaz de atravesar la membrana de las fibras huecas.

Estos ensayos por FPLC permitieron determinar que el tamaño de poro de las membranas utilizadas, cuyo valor de corte es de 50 kDa, impide el pasaje de proteínas plasmáticas hacia el compartimiento biológico, lo que evitaría el daño por parte de las proteínas del sistema inmune (anticuerpos, sistema del complemento) al componente biológico.

#### **4.2.3. ESTUDIO DE LA PROVISIÓN DE OXÍGENO EN LOS MINIBIORREACTORES**

En el diseño de un HBA es esencial que la arquitectura del biorreactor asegure que ninguna porción significativa del componente biológico sea expuesta a tensiones de oxígeno por debajo de la requerida para la viabilidad óptima y el rendimiento metabólico [86]. Debido a esto, estudiamos si la provisión de oxígeno dentro de nuestro MBR es apropiada para mantener al componente biológico viable y funcional.

Para asegurar una velocidad de transferencia de oxígeno adecuada, en los modelos de MBR diseñados, existen dos fuentes que proveen de oxígeno y cuyas contribuciones a la oxigenación del componente biológico fueron determinadas individualmente (ver Materiales y Métodos, página 77):

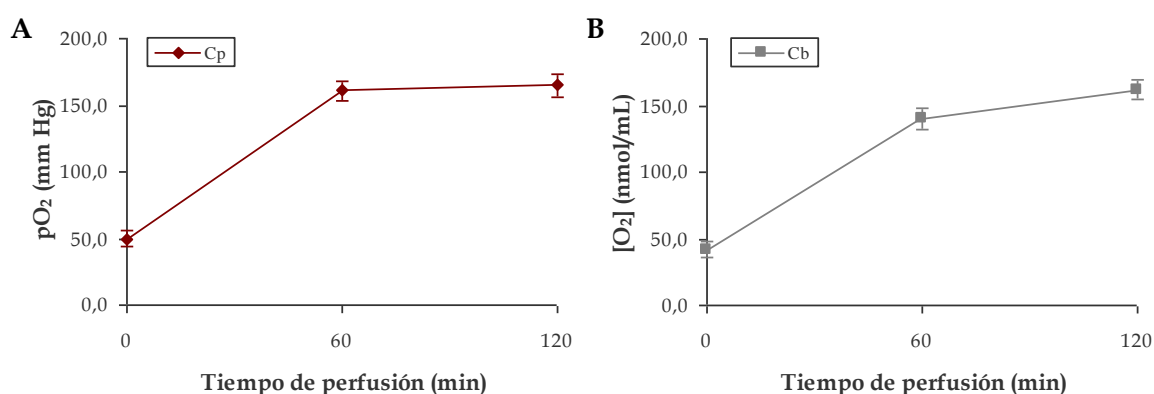
- un tubo oxigenador de silicona, que permite un flujo transmembrana total de oxígeno de  $0,65 \pm 0,03 \mu\text{mol}/\text{min}$  ( $n=3$ ).
- la sangre de carnero que perfunde el sistema, cuyo contenido promedio de oxígeno es de  $13,51 \pm 0,61 \text{ vol } \%$  ( $n=3$ ). Esto implica que, a un flujo de perfusión de  $9 \text{ mL}/\text{min}$ , la sangre provee  $1,22 \text{ mL O}_2/\text{min}$ , lo que equivale a  $54,28 \mu\text{mol}/\text{min}$ .

Dado que estos resultados muestran que la sangre es la principal fuente de oxígeno en el MBR, se analizó si el oxígeno transportado por la misma puede liberarse y permear hacia el compartimiento biológico, donde es necesario para mantener la viabilidad y funcionalidad del componente biológico ( $n=3$ , ver Materiales y Métodos, página 80). Como se muestra en la Figura 27, las



concentraciones de oxígeno en la sangre y en el compartimiento biológico aumentan con el tiempo.

El aumento de la  $pO_2$  en el compartimiento sanguíneo (Figura 27 A) se debe a la reoxigenación de la sangre durante su recirculación en el sistema; el aumento observado para el compartimiento biológico (Figura 27 B) se debe a la difusión del oxígeno sanguíneo ya que, en este caso, no se aportó carbógeno a través del tubo oxigenador. Esto confirma que la principal fuente de oxígeno para el componente biológico la constituye la sangre que perfunde el sistema, mientras que la función del carbógeno que se introduce a través del oxigenador sería la de mantener constante el pH del fluido que contiene al mismo.



**Figura 27:** Evolución del contenido de oxígeno en los compartimientos A) sanguíneo ( $pO_2$ ) y B) biológico (nmol/mL,  $n=3$ ).

Considerando que la velocidad específica de consumo de oxígeno por los MOHs de rata es de  $1,13 \pm 0,11 \mu\text{moles } O_2/\text{min} \times \text{g tejido húmedo}$  (ver página 93) y que se utiliza aproximadamente una masa de 1,5 gramos, la velocidad de consumo de oxígeno en el MBR sería de  $1,70 \mu\text{moles } O_2/\text{min}$ . Por lo tanto, con este suplemento de oxígeno de unos  $55 \mu\text{moles}/\text{min}$ , no existen limitaciones que puedan llegar a comprometer las funciones del componente biológico.

### 4.3. ESTUDIOS SOBRE LA VALIDACIÓN *IN VITRO* DE LOS MINIBIORREACTORES

En el Capítulo I de Resultados y Discusión de este trabajo de tesis se describió la puesta a punto de los métodos de obtención y preservación del componente biológico seleccionado para ser utilizado en nuestro HBA, los microórganos hepáticos (MOHs). Luego, en el Capítulo II, se analizaron parámetros de funcionamiento de los diferentes MBR diseñados, en ausencia de componente biológico.

Finalmente, una vez seleccionado el componente biológico y diseñado el modelo de biorreactor a escala de laboratorio, el sistema debe validarse, chequeando su habilidad para sostener una buena viabilidad y funcionalidad del biocomponente elegido. Así, en este último capítulo de Resultados y Discusión, se expondrán los resultados obtenidos durante el proceso de validación de los distintos MBR diseñados.

#### **4.3.1. ESTUDIOS SOBRE EL DESEMPEÑO DE MOHs FRESCOS EN EL MBR CILÍNDRICO. COMPARACIÓN CON EL SRN**

El primer MBR diseñado para el uso de MOHs como componente biológico poseía un cuerpo cilíndrico de unos 45 cm<sup>3</sup> de capacidad y demostró un adecuado funcionamiento en cuanto a perfusión sanguínea y difusión de metabolitos entre compartimientos (ver sección 4.2.1.2.). Una vez determinado su correcto desempeño sin componente biológico, se realizaron los estudios de validación utilizando MOHs frescos. Los resultados obtenidos para los diferentes parámetros de viabilidad y funcionalidad analizados se describen a continuación, en comparación con los valores ya expuestos para MOHs frescos (controles) en el SRN (ver secciones 4.1.2.2. y 4.1.2.3.).

Como fue explicitado en la sección de Materiales y Métodos, el parámetro elegido para evaluar la viabilidad de los MOHs dentro del MBR fue la determinación de la liberación al medio de la enzima LDH, ya que se trata de un método simple, rápido y preciso. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8, en la que también se exponen los valores determinados para MOHs controles en el SRN (ver página 90). Al comparar entre ambos sistemas de reoxigenación, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de LDH liberados por los MOHs a los distintos tiempos estudiados. La cantidad de enzima

citósica liberada al medio aumenta de manera significativa con el tiempo tanto para el MBR como para el SRN, aunque este parámetro se mantiene dentro de valores aceptables luego de los 120 minutos. Por ello, podemos afirmar que la evolución de este parámetro demuestra un adecuado mantenimiento de la viabilidad de los MOHs dentro del MBR.

El análisis del consumo de oxígeno durante la reoxigenación normotérmica permite evaluar una función altamente relevante para el tejido y advertir la existencia de daños en el mismo. Los valores obtenidos para este parámetro funcional se exponen en la Tabla 8, en comparación con los resultados para MOHs reoxigenados en el SRN ya expuestos (ver página 93). Puede observarse que los MOHs frescos mantienen un consumo de oxígeno estable durante las dos horas de reoxigenación en el MBR. Además, no se observan diferencias estadísticas con respecto a los valores obtenidos en el SRN, a pesar de que en este sistema se observa una disminución luego de 60 y 120 minutos en comparación con el valor inicial. En base a estos resultados, podemos inferir que los MOHs frescos mantienen un índice respiratorio similar en ambos sistemas de reoxigenación.

**TABLA 8:** Parámetros de viabilidad y funcionalidad evaluados para MOHs frescos en el MBR cilíndrico con un Cb de 45 cm<sup>3</sup> (n=3). Comparación con el SRN (n=3).

Parámetros evaluados		Liberación de LDH (%)			Consumo de oxígeno (μmol/min.g tejido húmedo)		
Tiempo (min)		0	60	120	0	60	120
Modelo	MBR cilíndrico	1,9 ± 0,9	9,4 ± 3,0 <sup>#</sup>	14,7 ± 3,1 <sup>#</sup>	1,21 ± 0,24	1,15 ± 0,20	1,16 ± 0,21
	SRN	2,6 ± 0,1	8,3 ± 1,2 <sup>#</sup>	15,8 ± 3,1 <sup>#</sup>	1,13 ± 0,11	0,85 ± 0,15 <sup>♦</sup>	0,84 ± 0,15 <sup>♦</sup>

# diferente de los demás tiempos; ♦ diferente de tiempo 0.

Como ya fuera expuesto con anterioridad, es fundamental que todo componente biológico de un HBA sea capaz de detoxificar amonio, ya que la acumulación de este metabolito en la sangre de pacientes con falla hepática aguda está implicada en la progresión de dicha patología. Por ello, se analizaron diversos parámetros relacionados con el metabolismo de esta molécula en MOHs frescos reoxigenados en el MBR cilíndrico.

Los valores obtenidos al estudiar la expresión génica relativa y la actividad de las dos principales enzimas del ciclo de la urea, CPSI y OTC, se muestran en las Tablas 9 y 10, respectivamente. No se observaron diferencias significativas para estos parámetros entre los MOHs controles reoxigenados en el MBR con respecto a los reoxigenados en el SRN, lo que indicaría que los mismos cuentan con los niveles enzimáticos necesarios para llevar a cabo la detoxificación de amonio. Sin embargo, a pesar de estas similitudes, los MOHs frescos no fueron capaces de detoxificar amonio ni de sintetizar urea en cantidades significativas al ser usados como biocomponente en el MBR cilíndrico.

**TABLA 9:** Expresión génica relativa de CPSI y OTC para MOHs frescos en el MBR cilíndrico con un Cb de 45 cm<sup>3</sup> (n=3). Comparación con el SRN (n=3).

Expresión génica relativa		Carbamil Fosfato Sintetasa I (CPSI)			Ornitina Transcarbamilasa (OTC)		
Tiempo (min)		0	60	120	0	60	120
Modelo	MBR cilíndrico	1,05 ± 0,17	0,84 ± 0,09	0,63 ± 0,12	1,02 ± 0,26	0,87 ± 0,21	0,67 ± 0,20
	SRN	1,00 ± 0,24	0,96 ± 0,12	0,86 ± 0,10	1,00 ± 0,20	0,87 ± 0,16	0,82 ± 0,07

**TABLA 10:** Actividad enzimática de CPSI y OTC para MOHs frescos en el MBR cilíndrico con un Cb de 45 cm<sup>3</sup> (n=3). Comparación con el SRN (n=3).

Actividad enzimática		CPSI (U/g tejido húmedo)			OTC (U/g tejido húmedo)		
Tiempo (min)		0	60	120	0	60	120
Modelo	MBR cilíndrico	2,48 ± 0,62	2,72 ± 0,61	3,03 ± 0,86	241,7 ± 12,6	235,1 ± 11,9	222,0 ± 23,5
	SRN	2,47 ± 0,60	2,82 ± 0,76	3,12 ± 0,73	209,7 ± 33,2	251,8 ± 29,4	228,8 ± 32,8

A partir de los datos expuestos puede observarse que, a pesar de las modificaciones realizadas al MBR de cuerpo cilíndrico utilizado en nuestro laboratorio para alojar hepatocitos en suspensión (ver sección 4.2.1.2., página 112), no se obtuvo una adecuada detoxificación de amonio al utilizar MOHs como componente biológico. Consideramos que la falta de detoxificación no estaría relacionada con un problema en la viabilidad del componente biológico en si, ya

que los demás parámetros ensayados muestran valores similares a los obtenidos en el SRN, en el que estos MOHs mostraron ser capaces de metabolizar un  $22,2 \pm 5,5$  % y un  $35,1 \pm 7,0$  % de la dosis inicial de amonio luego de 60 y 120 minutos de reoxigenación, respectivamente ( $n = 3$ ).

El diseño cilíndrico resultó adecuado para el uso de hepatocitos aislados, ya que los mismos son capaces de mantenerse en suspensión y de distribuirse homogéneamente en todo el compartimiento celular [114]. En el caso de los MOHs, el peso del tejido los lleva a depositarse unos sobre otros en la superficie inferior del compartimiento biológico, lo que dificultaría el acceso de toda la masa de microórganos a los niveles de nutrientes necesarios para mantener una función tan demandante energéticamente como lo es la detoxificación de amonio a través del ciclo de la urea. Además, esta disposición podría dificultar los procesos difusivos de intercambio entre los MOHs y el medio, necesarios para su adecuado desempeño, ya que gran parte de la superficie del tejido se encuentra bloqueada por dicho apilamiento.

El análisis de todos estos resultados nos llevó a modificar la arquitectura cilíndrica del sistema, con el fin de adecuarla al uso de MOHs como componente biológico.

#### **4.3.2. ESTUDIOS SOBRE EL DESEMPEÑO DE MOHs FRESCOS Y PRESERVADOS 48 H EN EL MBR DE BASE PLANA**

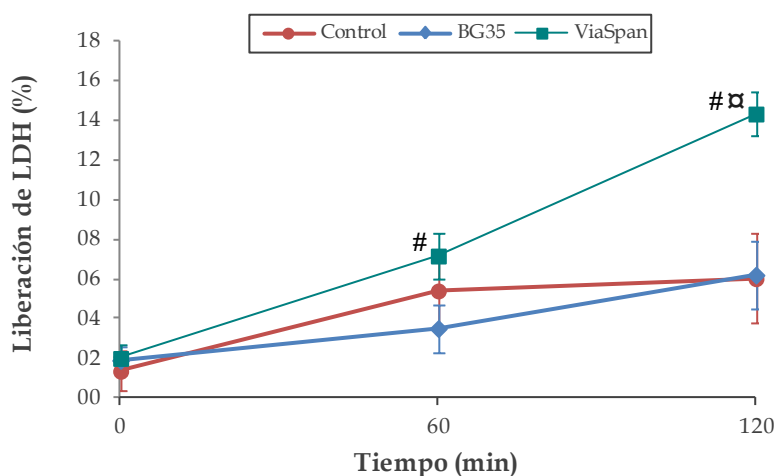
En el SRN, las placas de cultivo utilizadas para la reoxigenación de los MOHs ofrecen una superficie inferior plana que les permite distribuirse y mantenerse con toda su superficie expuesta al medio externo. Buscando mimetizar estas condiciones en nuestro sistema, diseñamos un MBR con un compartimiento biológico de base plana (ver sección 4.2.1.3., página 114). Los resultados obtenidos en la etapa de validación de este nuevo diseño se describen a continuación.

En primer lugar, se evaluó el desempeño de MOHs frescos en el nuevo MBR de base plana. Como ya fuera expuesto anteriormente, los MOHs controles demostraron ser capaces de detoxificar un  $22,2 \pm 5,5$  % y un  $35,1 \pm 7,0$  % de la dosis inicial de amonio luego de 60 y 120 minutos de reoxigenación en el SRN,

respectivamente ( $n = 3$ ). En el nuevo modelo de base plana, los valores observados para MOHs controles fueron de  $32,1 \pm 2,2 \%$  y de  $49,3 \pm 8,8 \%$  a los 60 y 120 minutos, respectivamente ( $n = 3$ ). Al comparar entre ambos sistemas de reoxigenación, no se encontraron diferencias significativas en este parámetro, lo que indica que nuestra hipótesis acerca de la influencia de la arquitectura del MBR sobre la capacidad de los MOHs para metabolizar amonio fue correcta.

Una vez comprobada la adecuación del nuevo diseño de MBR al uso de MOHs como componente biológico, en lo que respecta a detoxificación de amonio fundamentalmente, se incorporaron en el estudio los grupos preservados.

Como parámetro de viabilidad se determinó la cantidad de LDH liberada al medio por MOHs controles y preservados 48 h en las soluciones BG35 y ViaSpan® cuando los mismos son utilizados como componente biológico en nuestro modelo de base plana (Figura 28). La cantidad de enzima liberada permanece estable para los grupos Control y BG35 durante las dos horas de perfusión en el MBR. En el caso de los MOHs preservados en ViaSpan® se observa un aumento significativo en este parámetro a medida que transcurre el tiempo de reoxigenación en el MBR. Este incremento lleva a que, al final del período de perfusión, el nivel de LDH liberada para este grupo sea estadísticamente superior al de los otros dos grupos estudiados (ver Figura 28). Los valores alcanzados luego de los 120 minutos en el MBR son los siguientes:  $6,0 \pm 2,3\%$  para el grupo control;  $6,2 \pm 1,7\%$  para BG35 y  $14,3 \pm 1,1\%$  para ViaSpan® ( $\square$  diferente de los demás grupos,  $p < 0,05$ ,  $n = 3$ ).



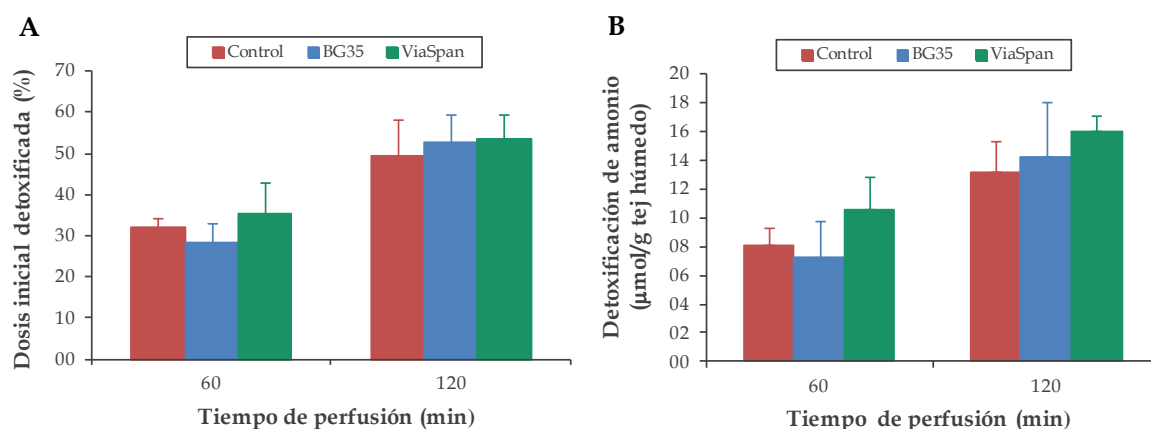
**Figura 28:** Evolución de la Liberación de LDH (%) para MOHs controles y MOHs preservados 48 h en las soluciones BG35 y ViaSpan® utilizados como componente biológico en el MBR de base plana. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

# diferente de los demás tiempos,  $p < 0,05$ ;  $\square$  diferente de los demás grupos,  $p < 0,05$ .

La menor liberación de LDH por parte de los MOHs preservados en BG35, respecto a los preservados en ViaSpan®, puede ser atribuida al efecto protector de membranas del PEG ya analizado en el Capítulo I de Resultados y Discusión (ver página 91).

A pesar de que los MOHs preservados en ViaSpan® presentan un mayor porcentaje de liberación de LDH que los otros dos grupos luego de 120 minutos, los valores de liberación de LDH alcanzados en el MBR son estadísticamente inferiores a los medidos en el SRN para todos los grupos evaluados (ver sección 4.1.2.2.1.). Esto permite aseverar que el modelo diseñado posibilita que los MOHs mantengan una adecuada viabilidad durante las dos horas de perfusión ensayadas.

En la sección anterior se expusieron los resultados para diferentes parámetros funcionales de MOHs controles en el MBR cilíndrico. Al compararlos con los niveles observados en el SRN no se observaron diferencias significativas entre ambos sistemas. Sin embargo, los MOHs frescos no pudieron ser capaces de detoxificar amonio en el MBR, mientras que si pudieron hacerlo en el SRN. Por ello, en el nuevo MBR de base plana diseñado, nos centramos en el análisis de la capacidad de detoxificación de amonio, función imprescindible que debe llevar a cabo un HBA. En la Figura 29 se muestran los resultados obtenidos para este estudio, tanto en MOHs controles como preservados 48 h en las soluciones BG35 y ViaSpan®.



**Figura 29:** Evolución de A) Dosis inicial de amonio detoxificada (%) y B) Detoxificación de amonio ( $\mu\text{mol/g}$  tejido húmedo) para MOHs controles y MOHs preservados 48 h en las soluciones BG35 y ViaSpan® utilizados como componente biológico en el MBR de base plana. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SD,  $n = 3$ .



En la Figura 29 A puede apreciarse que los grupos preservados, al ser utilizados como biocomponente del MBR de base plana, fueron capaces de detoxificar un porcentaje de dosis inicial de amonio similar al grupo control, a los dos tiempos evaluados. Luego de dos horas de perfusión, la dosis inicial detoxificada (%) por los diferentes grupos fue de  $49,3 \pm 8,8$  % para los controles;  $52,9 \pm 6,5$  para BG35, y  $53,6 \pm 6,0$  para ViaSpan® (n = 3).

Para ofrecer una idea clara de la cantidad de amonio que son capaces de metabolizar los MOHs en el MBR de base plana, en la Figura 29 B se expresa la detoxificación de amonio en  $\mu$ moles de este compuesto por gramo de tejido húmedo. Los valores alcanzados al finalizar el período de perfusión fueron: **Control:**  $13,2 \pm 2,2$ ; **BG35:**  $14,2 \pm 3,8$ , y **ViaSpan®:**  $16,0 \pm 1,1$   $\mu$ moles de  $\text{NH}_4^+$  detoxificados/g de tejido húmedo (n = 3). Todos los grupos estudiados presentan niveles de detoxificación de amonio similares a los dos tiempos ensayados, por lo que el MBR de base plana permite que tanto MOHs frescos como preservados mantengan su capacidad de metabolizar este compuesto durante las dos horas de perfusión evaluadas.

Como indicador del mantenimiento de la integridad del tejido hepático, se analizó la morfología de MOHs controles y MOHs preservados 48 h en las soluciones BG35 y ViaSpan®, al inicio y luego de dos horas de reoxigenación en el MBR. Los MOHs fueron fijados en formol al 10 % y procesados histológicamente hasta su inclusión en parafina. Se realizaron cortes de tejido de 5  $\mu$ m, los que se colorearon con hematoxilina – eosina y se observaron con microscopía de campo claro utilizando un aumento de 200 X.

Los MOHs controles presentan morfología normal con una arquitectura trabecular altamente conservada con células endoteliales fusiformes normales, tanto al inicio como al final del período de reoxigenación en el MBR (Figuras 30 A y B).

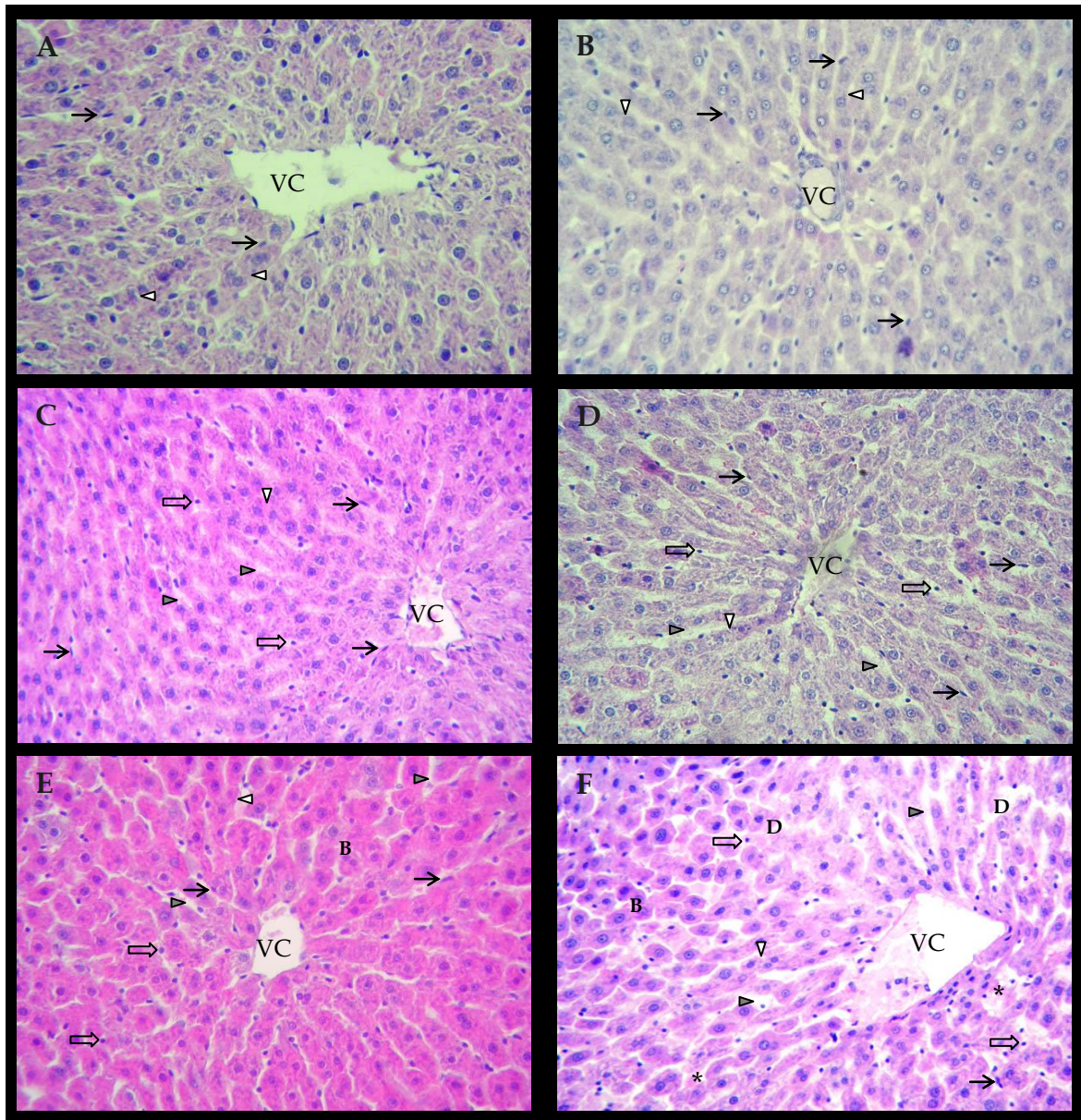
Los MOHs preservados en BG35, al inicio, muestran morfología trabecular conservada con sinusoides levemente dilatados y células endoteliales de morfología mixta: fusiformes, adheridas a la matriz extracelular perisinusoidal, o redondeadas, adheridas a la matriz (Figura 30 C). Luego de 120 min, muestran

morfología trabecular conservada con sinusoides dilatados y abundantes células endoteliales redondeadas, tanto adheridas a la matriz como en el lumen sinusoidal (Figura 30 D).

Los MOHs preservados en ViaSpan® presentan, al inicio de la perfusión, hepatocitos balonizados, abundantes células endoteliales redondeadas unidas a la matriz extracelular perisinusoidal y sinusoides dilatados (Figura 30 E). Al final del período de perfusión, también presentan abundantes blebs y zonas de disrupción trabecular (Figura 30 F).

El análisis morfológico de los MOHs controles y preservados permite apreciar que, dentro del MBR de base plana, los mismos mantienen su integridad tisular de manera similar a lo observado para el SRN (ver sección 4.1.2.4., página 100). Nuevamente, los daños observados en el tejido podrían ser adjudicados al proceso de preservación, dado que los MOHs controles presentan una morfología normal tanto al inicio como al final de la perfusión en el MBR.

En base a los resultados expuestos en esta sección, podemos concluir que el nuevo modelo de MBR, con un compartimiento biológico de base plana, permitió un adecuado desempeño de los MOHs como componente biológico, mostrando la importancia de la arquitectura y la configuración del componente artificial en el diseño de un HBA.



**Figura 30: Hematoxilina-eosina de MOHs control y MOHs preservados 48 h, durante la reoxigenación en el MBR.** Se tomaron muestras tanto al inicio ( $t=0$  min) como al final de la reoxigenación ( $t=120$  min). Magnificación: 200X; VC: vena central.

MOHs control: **A)**  $t = 0$  min. Morfología del parénquima hepático conservada, con células endoteliales de forma fusiforme y adheridas a la matriz extracelular (flechas negras), y cordones de hepatocitos sin alteraciones (triángulos blancos). **B)**  $t = 120$  min. Las características morfológicas del tejido hepático son iguales a las descritas en A.

MOHs preservados 48 h en BG35: **C)**  $t = 0$  min. Morfología trabecular conservada (triángulos blancos), células endoteliales de morfología mixta: fusiformes (flechas negras) y redondeadas (flechas anchas), y sinusoides levemente dilatados (triángulo gris). **D)**  $t = 120$  min. Se observan las mismas características morfológicas descritas en C.

MOHs preservados 48 h en ViaSpan®: **E)**  $t = 0$  min. Morfología trabecular conservada (triángulos blancos), células endoteliales de morfología mixta: fusiformes (flechas negras) y redondeadas (flechas anchas), sinusoides levemente dilatados (triángulo gris) y hepatocitos balonizados (B). **F)**  $t = 120$  min. Se observan todas las características morfológicas descritas en E, junto con la aparición de blebs (\*) y de zonas de disrupción trabecular (D).

#### 4.3.3. COMPARACIÓN DEL DESEMPEÑO DE MOHs FRESCOS Y HEPATOCITOS RECIÉN AISLADOS COMO COMPONENTE BIOLÓGICO EN NUESTROS MODELOS DE MBR

En el primer MBR diseñado en nuestro laboratorio, previo al inicio de este trabajo de tesis, se utilizaron con éxito suspensiones de hepatocitos como componente biológico [114]. Como se demostró en este capítulo, este MBR no resultó adecuado para el uso de MOHs como componente biológico, debiendo para ello adaptarse la arquitectura del sistema. A modo de comparación entre ambos sistemas de HBA, en la Tabla 11 se detalla la capacidad de detoxificación de amonio de MOHs frescos en el modelo de base plana y de suspensiones de hepatocitos recién aislados en el modelo cilíndrico.

Los MOHs presentan, en comparación con los hepatocitos, un menor nivel de detoxificación de amonio luego de 60 minutos en el MBR. Sin embargo, luego de 120 minutos, los MOHs mejoraron su desempeño y se mostraron capaces de detoxificar amonio en cantidades similares a las suspensiones de hepatocitos, dado que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

**TABLA 11:** Capacidad de detoxificación de amonio ( $\mu\text{mol/g}$  tejido húmedo) para MOHs y hepatocitos frescos utilizados como componente biológico del MBR de base plana y cilíndrico, respectivamente (n=3).

Tiempo (min)	Capacidad de detoxificación de amonio ( $\mu\text{mol/g}$ tejido húmedo)	
	MOHs	Hepatocitos
60	$8,1 \pm 1,2^{\blacksquare}$	$12,5 \pm 1,8$
120	$13,2 \pm 2,2$	$18,6 \pm 4,9$

$128 \times 10^6$  hepatocitos = 1 g de hígado;  $\blacksquare$  diferente de los hepatocitos a tiempo 60

Por otro lado, los MOHs presentan ciertas ventajas en comparación con los hepatocitos aislados:

- Contienen todos los tipos celulares hepáticos y representan la complejidad del órgano intacto, lo que podría ser importante al analizar otras funciones

hepáticas que un HBA debe suplir en pacientes con FHA, como por ejemplo la detoxificación de ciertos fármacos y metabolitos.

- La metodología de obtención es muy sencilla y es la misma para todas las especies animales a ser utilizadas como fuente de este componente biológico.
- La técnica de obtención y corte no requiere de digestión enzimática, lo que reduce el daño a las células y minimiza los costos, y tampoco es necesario ningún tipo de equipamiento especial para llevarla a cabo.

Los resultados descriptos en la sección anterior muestran que los MOHs sometidos a preservación hipotérmica por 48 h en la solución BG35, diseñada en nuestro laboratorio, conservan una adecuada tasa de detoxificación de amonio, similar a la de MOHs controles y MOHs preservados 48 h en la solución Gold Standard ViaSpan®, al ser utilizados como componente biológico en el MBR de base plana. El contar con un método adecuado de preservación de MOHs podría asegurar la disponibilidad continua del biocomponente, requerimiento imprescindible para que un HBA se convierta en una herramienta terapéutica útil para el tratamiento de pacientes con FHA.

## 5. CONCLUSIONES

### **5.1. CONCLUSIONES PARCIALES**

En base a los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de tesis podemos arribar a las siguientes conclusiones:

*En lo que respecta al estudio del componente biológico, su obtención y preservación:*

- Nuestra técnica manual de corte se ha optimizado y validado, ya que permitió obtener MOHs de rata de un espesor adecuado y con una alta reproducibilidad, de manera similar a instrumentos de precisión, como el cortador Krumdieck o el Brendel-Vitron.
- La solución BG35, desarrollada en nuestro laboratorio, presenta una eficacia similar a la de la solución Gold Standard ViaSpan® para proteger MOHs de rata contra los daños por isquemia fría/reoxigenación. Los MOHs de rata almacenados 48 h en hipotermia en BG35 mantuvieron niveles de viabilidad y funcionalidad similares incluso a los de MOHs frescos, durante el período de reoxigenación normotérmica.
- Los MOHs preservados en solución BG35 mantuvieron una adecuada capacidad para detoxificar amonio y sintetizar urea durante la reoxigenación, lo que posibilita su uso como componente biológico en un sistema de HBA. El poseer un método eficaz de preservación para nuestro componente biológico nos permite contar con el mismo en cantidad y calidad, y en el momento en el que sea necesario.
- El agregado del compuesto dador de monóxido de carbono, CORM-3, durante la preservación hipotérmica de MOHs de rata en solución BG35, tuvo un efecto beneficioso sobre el consumo de oxígeno pero no se observó efecto alguno sobre la capacidad de detoxificación de amonio de los mismos. Por esta razón, se decidió no evaluar, posteriormente, el desempeño de MOHs preservados en BG35 con el agregado de CORM-3 en nuestro modelo de HBA, ya que no eran de esperarse mejoras en esta tarea fundamental que todo componente biológico debe llevar a cabo.

*En lo que respecta al desarrollo y optimización del componente artificial:*

- Los MBR diseñados como parte de este trabajo de tesis muestran un adecuado funcionamiento *in vitro* en cuanto a intercambio de fluidos y metabolitos, no observándose pérdidas ni interacciones inespecíficas de los compuestos evaluados (glucosa y amonio) con alguno de sus componentes.
- El grado de hemólisis generado en nuestros sistemas, luego de 120 minutos de perfusión, es mínimo, lo que los hace aptos para el uso en pacientes. Ese pequeño porcentaje puede atribuirse al funcionamiento de la bomba peristáltica que impulsa la sangre.
- Las fibras de Polyamix™ utilizadas permiten un adecuado flujo sanguíneo a través de todo el sistema de perfusión y un correcto intercambio de solutos y fluidos entre ambos compartimientos del MBR, no observándose hemoconcentración. Estas características las hacen aptas para la construcción de nuestros MBR.
- Los ensayos por FPLC permitieron determinar que el tamaño de poro de las membranas utilizadas, cuyo valor de corte es de 50 kDa, impide el pasaje de proteínas plasmáticas hacia el compartimiento biológico. Esto protegería al componente biológico de daños que pudieran provocarle las proteínas del sistema inmune (anticuerpos, sistema del complemento), prolongando su sobrevivencia dentro del MBR.
- La provisión de oxígeno en los MBR diseñados es adecuada para sostener los requerimientos metabólicos del componente biológico. Con el suplemento actual de unos 55  $\mu$ moles de oxígeno/min, no existirían limitaciones que pudieran llegar a comprometer las funciones del mismo.

*En lo que respecta a la validación in vitro de los MBR diseñados:*

- El MBR de cuerpo cilíndrico, que resultó adecuado para el uso de suspensiones de hepatocitos como componente biológico, no permitió la correcta detoxificación de amonio por parte de MOHs de rata. El cambio



por un MBR de base plana revirtió esta situación. Esto nos lleva a concluir que, en el desarrollo de un HBA, la arquitectura del MBR debe adecuarse a las necesidades del componente biológico para lograr un óptimo desempeño del mismo, tal como se ha demostrado en esta tesis.

- El MBR de base plana tiene un diseño sencillo y está construido con materiales estándar. Además de su uso como parte de un HBA, podría utilizarse como una herramienta de laboratorio útil para investigar los efectos de diferentes protocolos de preservación, criopreservación o cultivo sobre las funciones sintéticas o de detoxificación de MOHs provenientes de diferentes fuentes.
- Tanto los MOHs en el MBR de base plana como las suspensiones de hepatocitos en el MBR cilíndrico mostraron la misma capacidad para detoxificar amonio, luego de 120 minutos de perfusión, por lo que ambos modelos pueden desempeñarse adecuadamente como componente biológico de un HBA. En nuestro caso, optamos por los MOHs, ya que presentan las ventajas, frente a las suspensiones de hepatocitos, de una metodología de obtención más sencilla, que no requiere de equipamiento especial ni de reactivos costosos, y que es la misma para todas las especies.
- Nuestro prototipo ha superado con éxito la etapa de validación *in vitro*, lo que posibilita continuar con las siguientes fases de escalado y evaluación en modelos animales.

## **5.2. CONCLUSIÓN GENERAL**

El objetivo general planteado para este trabajo de tesis fue desarrollar un prototipo de biorreactor que pueda ser utilizado como dispositivo de asistencia extracorporeal para soporte de la función hepática, principalmente, en casos de falla hepática aguda.

En base a los resultados expuestos en los diferentes capítulos de esta tesis, podemos concluir que se ha cumplido con éxito una primera gran etapa a escala de laboratorio para alcanzar dicho objetivo general. Al respecto, se ha

seleccionado un componente biológico que presenta una adecuada capacidad para detoxificar amonio, los microórganos hepáticos o MOHs; se han optimizado las técnicas de obtención y preservación de dicho biocomponente, con el fin de asegurar la disponibilidad continua del mismo, requerimiento imprescindible para que un HBA se convierta en una herramienta terapéutica útil para el tratamiento de pacientes con FHA, y se ha diseñado un MBR de base plana capaz de sostener una buena viabilidad y funcionalidad del componente biológico elegido.

A pesar de todos estos avances, todavía queda un largo camino por recorrer que involucra, en primera instancia, las etapas de escalado y evaluación en modelos animales. Una vez superadas todas las etapas de desarrollo y estudios pre-clínicos (ensayos *in vitro* y en modelos animales), el prototipo diseñado se encontraría en condiciones de ser evaluado en humanos.

## 6. RESUMEN

La Falla Hepática Aguda (FHA) es un desorden complejo y devastador que afecta a pacientes sin enfermedad hepática preexistente. Es una patología de rápida progresión, asociada con una alta tasa de mortalidad [13]. Actualmente, el único tratamiento efectivo disponible es el Trasplante Hepático Ortotópico (THO).

El número de trasplantes hepáticos que se lleva a cabo en la actualidad se mantiene estable, mientras que el número de pacientes en lista de espera para un nuevo órgano se sigue incrementando. Por ello, uno de los principales problemas a los que se enfrenta hoy en día esta terapia lo constituye la escasez de órganos. Con el fin de evitar el desarrollo de complicaciones o la muerte de pacientes durante el período de espera, se están evaluando diferentes opciones alternativas al tradicional THO. Entre estas, destacan los hígados bioartificiales (HBA).

Los HBA son dispositivos extracorporales que constan de tejido hepático o de hepatocitos funcionales (el componente biológico), alojado dentro de un biorreactor fabricado por el hombre (el componente sintético o artificial) y separado de la circulación sanguínea por membranas semipermeables [26].

Una de las claves para el óptimo rendimiento de un HBA es la correcta elección del componente biológico. A su vez, la arquitectura del biorreactor debe adecuarse al componente biológico elegido, permitiendo el acceso del mismo a los nutrientes necesarios para llevar a cabo funciones hepato-específicas. Finalmente, una vez seleccionado el componente biológico y diseñado el modelo de biorreactor a escala de laboratorio, el sistema debe validarse, chequeando su habilidad para sostener una buena viabilidad y funcionalidad del componente biológico elegido.

Dentro de este marco, nos planteamos el objetivo de desarrollar un prototipo de biorreactor que pueda ser utilizado como dispositivo de asistencia extracorporal para soporte de la función hepática, principalmente, en casos de FHA.

En primer lugar, seleccionamos como componente biológico para nuestro sistema a los microórganos hepáticos (MOHs), que son cortes de hígado, tipo láminas, de unos 400  $\mu\text{m}$  de espesor, que mantienen la micro-arquitectura básica del lobulillo hepático y, por lo tanto, conservan sus características fisiológicas. Esta elección se fundamentó en el hecho de que se considera que el componente biológico “ideal” para ser aplicado a un HBA debe ser aquel que tenga en su

composición todos los tipos de células hepáticas, con el objetivo de obtener una máxima respuesta. Una vez seleccionado el componente biológico, se optimizó el método de obtención y corte manual de los mismos, obteniéndose MOHs de un espesor de  $338 \pm 27 \mu\text{m}$  ( $n=25$ ), valor que se encuentra dentro del rango óptimo (mayor a  $200 \mu\text{m}$  y menor a  $500 \mu\text{m}$ ) indicado en la literatura [39].

Para que el HBA se convierta en una herramienta terapéutica útil es necesario desarrollar algún método de preservación del componente biológico, que permita mantenerlo viable y funcional, de manera de poder utilizarlo clínicamente cuando sea requerido. El método elegido en este trabajo de tesis fue la preservación por isquemia fría: almacenamiento estático, en frío ( $0$  a  $4^\circ\text{C}$ ), en anoxia (bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ ) y en una solución especialmente diseñada para tal fin [52]. Para poder contar con una solución adecuada para la preservación de MOHs, nuestro equipo de trabajo desarrolló la solución BG35 [58].

En este trabajo de tesis se profundizó en el estudio de la preservación de MOHs de rata en esta solución BG35, haciendo hincapié en la evaluación del metabolismo de amonio durante la etapa de reoxigenación. Esto se debe a que, previo a su uso en un HBA, es fundamental constatar que el componente biológico elegido mantenga su capacidad para detoxificar amonio, ya que la acumulación en sangre de dicho metabolito es el principal agente causal de los daños neurológicos asociados a la FHA [13].

Para ello, tanto MOHs frescos (recién cortados) como los MOHs preservados en BG35 y ViaSpan® (solución Gold Standard), luego de las 48 h de almacenamiento en frío, fueron evaluados en un sistema *in vitro* de reoxigenación normotérmica, en el que se tomaron muestra a los tiempos 0, 60 y 120 min.

Los MOHs preservados en BG35 mantuvieron valores similares a los de MOHs frescos para todos los parámetros de viabilidad (liberación de LDH y contenido de glucógeno) y funcionalidad (consumo de oxígeno y contenido de agua total) evaluados. En cuanto a los parámetros ensayados sobre el metabolismo de amonio, a pesar de algunas diferencias observadas en los niveles de transcripto y de actividad enzimática para Carbamil Fosfato Sintetasa I y Ornitina Transcarbamilasa, las dos principales enzimas del ciclo de la urea, los MOHs

preservados en BG35 fueron capaces de detoxificar amonio y sintetizar urea de manera similar a MOHs frescos y preservados en ViaSpan®, luego de 120 min de reoxigenación. Esto los hace aptos para ser utilizados como componente biológico en un HBA.

Una vez optimizados los métodos de obtención y preservación del componente biológico, se desarrollaron dos prototipos de minibiorreactores (MBR), uno de cuerpo cilíndrico y el otro con un cuerpo de basa plana. Ambos modelos tienen una capacidad de 45 cm<sup>3</sup> y permiten un intercambio correcto de fluidos y metabolitos entre los compartimientos biológico y sanguíneo. En la construcción de los dos prototipos se utilizaron fibras de Polyamix™, obtenidas a partir de cartuchos de diálisis comercializados por la firma GAMBRO®, que posibilitan un adecuado transporte difusivo y convectivo de solutos a través de sus paredes.

En la etapa final de validación, se analizaron diferentes parámetros de viabilidad y funcionalidad para MOHs utilizados como componente biológico en nuestros MBR. En el modelo cilíndrico, los MOHs frescos no fueron capaces de detoxificar amonio, mientras que si pudieron hacerlo en el MBR de base plana, lo que demuestra la importancia de la arquitectura y la configuración del componente artificial en el diseño de un HBA. Por otro lado, los MOHs preservados en BG35 mostraron un porcentaje de liberación de LDH, un mantenimiento de su integridad morfológica y una capacidad para detoxificar amonio similar a los controles al desempeñarse como componente biológico en el MBR de base plana.

En base a todos los resultados enunciados anteriormente podemos concluir que:

- Nuestra técnica manual de corte se ha optimizado y validado, ya que permitió obtener MOHs de rata de un espesor adecuado y con una alta reproducibilidad.
- La solución BG35, desarrollada en nuestro laboratorio, permite que MOHs de rata almacenados 48 h en hipotermia mantengan niveles de viabilidad y funcionalidad similares a los de MOHs frescos durante todo el período de reoxigenación normotérmica.

- Los MOHs preservados en solución BG35 mantuvieron una adecuada capacidad para detoxificar amonio durante la reoxigenación, lo que posibilita su uso como componente biológico en un sistema de HBA. El poseer un método eficaz de preservación para nuestro componente biológico nos permite contar con el mismo en cantidad y calidad, y en el momento en el que sea necesario.
- Los MBR diseñados como parte de este trabajo de tesis muestran un adecuado funcionamiento *in vitro* en lo que respecta a intercambio de fluidos y metabolitos, no observándose pérdidas ni interacciones inespecíficas de los compuestos evaluados (glucosa y amonio) con alguno de sus componentes.
- En el desarrollo de un HBA, la arquitectura del MBR debe adecuarse a las necesidades del componente biológico para lograr un óptimo desempeño del mismo, tal como se ha demostrado en esta tesis.
- El MBR de base plana tiene un diseño sencillo y está construido con materiales estándar. Además de su uso como parte de un HBA, podría utilizarse como una herramienta de laboratorio útil para investigar los efectos de diferentes protocolos de preservación, criopreservación o cultivo sobre las funciones sintéticas o de detoxificación de MOHs provenientes de diferentes fuentes.
- Nuestro prototipo ha superado con éxito la etapa de validación *in vitro*, lo que posibilita continuar con las siguientes fases de escalado y evaluación en modelos animales.

## 7. BIBLIOGRAFÍA



1. Ross, M. H. y Pawlina, W. (2007) Histología, 5ª Edición. Editorial Panamericana, Buenos Aires-Bogotá-Caracas-Madrid-México-Porto Alegre, Capítulo 18: 624-639.
2. Rodríguez Garay, E. A. (2000). Funciones del hígado y de las vías biliares. En: Cingolani, H. E., Houssay, A. B. y colaboradores. Fisiología Humana de Houssay, 7ª Edición, Editorial El Ateneo, Buenos Aires, Sección III, Capítulo 16: 208-215.
3. Gumucio, J. J. y Berkowitz, C. M. (1989) Structural organization of the liver and function of hepatic acinus. Raven Press Ltd., Nueva York, pp. 2-17.
4. Geneser, F. (2001) Histología, 3ª Edición. Editorial Panamericana, Buenos Aires-Bogotá-Caracas-Madrid-México-Porto Alegre, Capítulo 18: 465-533.
5. Jauregui, H. O., Chowdhury, N. R. y Chowdhury, J. R. (1996) Use of mammalian liver cells for artificial liver support. Cell Transplantation, 5 (3): 353-367.
6. Kuiper, J., Brouwer, A., Knook, D. L. y van Berkel, T. J. C. (1994) Kupffer and Sinusoidal Endothelial Cells. En: Arias, I. M., Boyer, J. L., Fausto, N., Jakoby, W. B. y Schachter, D. A. (Editores) The Liver: Biology and Pathobiology, 3ª Edición, Raven Press Ltd., Nueva York, Capítulo 4: 791-817.
7. Garcia Aguirre, J. (2003) Anatomía e histología normales del hígado. En: Méndez-Sánchez, N. y Uribe Esquivel, M. (Editores) Conceptos actuales en hepatología, Editorial Masson Daymo, México, Capítulo 1: 3-8.
8. Luo, D. Z., Vermijlen, D., Ahishali, B., Triantis, V., Plakoutsi, G., Braet, F., Vanderkerken, K. y Wisse, E. (2000) On the cell biology of pit cells, the liver-specific NK cells. World Journal of Gastroenterology, 6 (1): 1- 11.

9. Sato, M., Suzuki, S., y Senoo H. (2003) Hepatic stellate cells: Unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Structure and Function*, 28 (2): 105-112.
10. Suematsu, M. y Aiso, S. (2001) Professor Toshio Ito: A Clairvoyant in pericyte biology. *Keio Journal Medicine*, 50 (2): 66-71.
11. [www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000205.htm](http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000205.htm)
12. Galetti, P. M. y Jáuregui, H. O. (2006) Liver Support Systems. En: Bronzimo J. D. (Editor) *The Biomedical Engineering Handbook*, 3<sup>ra</sup> Edición, CRC Press, Boca Ratón, Vol III, Capítulo 70.
13. Pathikonda M. y Munoz, S.J. (2010) Acute Liver Failure. *Annals of Hepatology*, 9 (1): 7-14.
14. Infante Velázquez, M. (2001) Insuficiencia Hepática Aguda. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 30 (5): 63-70.
15. Riordan, S. M. y Williams, R. (2000) Acute liver failure: targeted artificial and hepatocyte-based support of liver regeneration and reversal of multiorgan failure. *Journal of Hepatology*, 32 (1): 63-76.
16. Als-Nielsen, B. (2005) Treatment of hepatic encephalopathy – systematic Cochrane reviews of randomised clinical trials. PhD Thesis, Faculty of Health Sciences, University of Copenhagen.
17. Albrecht, J. y Norenberg, M. (2006) Glutamine: A Trojan Horse in Ammonia Neurotoxicity. *Hepatology*, 44 (4): 788-794.
18. Bernal, W., Hall, C., Karvellas, C. J., Auzinger, G., Sizer, E. y Wendon, J. (2007) Arterial Ammonia and Clinical Risk Factors for Encephalopathy and Intracranial Hypertension in Acute Liver Failure. *Hepatology*, 46 (6): 1844-1852.
19. Londoño Múnera, J. P., Bejarano Pineda, L. y Restrepo Gutiérrez, J. C. (2008) Encefalopatía hepática. *IATREIA*, 21 (4): 398-405.

20. Rose, C., Ytrebø, L. M., Davies, N. A., Sen, S., Nedredal, G. I., Belanger, M., Revhaug, A. y Jalan, R. (2007) Association of Reduced Extracellular Brain Ammonia, Lactate, and Intracranial Pressure in Pigs with Acute Liver Failure. *Hepatology*, 46 (6): 1883-1892.
21. Blei, A. (2000) Medical Therapy of Brain Edema in Fulminant Hepatic Failure. *Hepatology*, 32 (3): 666-669.
22. Davern, T. (2007) Predicting Prognosis in Acute Liver Failure: Ammonia and the Risk of Cerebral Edema. *Hepatology*, 46 (6): 1679-1681.
23. Rozga, J. (2006) Liver support technology – an update. *Xenotransplantation*, 13 (5): 380-389.
24. Poniachik, J., Quera, R. y Lui, A. (2002) Insuficiencia Hepática Fulminante. *Revista Médica de Chile*, 130 (6): 691-698.
25. Keeffe, E. (2001) Liver Transplantation: Current Status and Novel Approaches to Liver Replacement. *Gastroenterology*, 120 (3): 749-762.
26. Rahman, T. y Hodgson, H. (1999) Review article: liver support systems in acute hepatic failure. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 13 (10): 1255-1272.
27. Selden, C. (2005) Bioartificial Liver. En: Nedovic, V. y Willaert, R. (Editores) *Applications of Cell Immobilisation Biotechnology*, Springer, pp. 69-83.
28. Jauregui, H. (1999) Cellular Component of Bioartificial Liver Support Systems. *Artificial Organs*, 23 (10): 889-893.
29. Wang, Y., Susando, T., Lei, X., Anene-Nzelu, C., Zhou, H., Liang, L. H. y Yu, H. (2010) Current development of bioreactors for extracorporeal bioartificial liver. *Biointerphases*, 5 (3): FA116-FA131.
30. Tilles, A., Berthiaume, F., Yarmush, R., Tompkins, R. G. y Toner, M. (2002) Bioengineering of liver assist devices. *Journal of Hepatobiliary Pancreatic Surgery*, 9 (6): 686-696.

31. Di Nicuolo, G., van de Kerkhove, M-P., Hoekstra, R., Beld, M. G., Amoroso, P., Battisti, S., Starace, M., di Florio, E., Scuderi, V., Scala, S., Bracco, A., Mancini, A., Chamuleau, R. A. y Calise, F. (2005) No evidence of in vitro and in vivo porcine endogenous retrovirus infection after plasmapheresis through the AMC-bioartificial liver. *Xenotransplantation*, 12 (4): 286-292.
32. Di Nicuolo, G., D'Alessandro, A., Andria, B., Scuderi, V., Scognamiglio, M., Tammaro, A., Mancini, A., Cozzolino, S., Di Florio, E., Bracco, A., Calise, F. y Chamuleau, R. A. (2010) Long-term absence of porcine endogenous retrovirus infection in chronically immunosuppressed patients after treatment with the porcine cell-based Academic Medical Center bioartificial liver. *Xenotransplantation*, 17 (6): 431-439.
33. Deurholt, T., van Til, N. P., Chhatta, A. A., ten Bloemendaal, L., Schwartlander, R., Payne, C., Plevris, J. N., Sauer, I. M., Chamuleau, R. A., Oude Elferink, R. P., Seppen, J. y Hoekstra, R. (2009) Novel immortalized human fetal liver cell line, cBAL111, has the potential to differentiate into functional hepatocytes. *BMC Biotechnology*, 9 (10): 89-103.
34. Burra, P., Samuel, D., Wendon, J., Pietrangelo, A. y Gupta, S. (2004) Strategies for liver support: from stem cells to xenotransplantation. *Journal of Hepatology*, 41 (6): 1050-1059.
35. Sokal, E. (2011) From hepatocytes to stem and progenitor cells for liver regenerative medicine: advances and clinical perspectives. *Cell Proliferation*, 44 (1): 39-43.
36. Elke, G., Schievenbusch, S., Kolossov, E., Hengstler, J. G., Rotshteyn, T., Bohlen, H., Nierhoff, D., Hescheler, J. y Drobinskaya, I. (2012) Differentiation and Selection of Hepatocyte Precursors in Suspension Spheroid Culture of Transgenic Murine Embryonic Stem Cells. *PlosOne*, 7 (9): e44912.

37. Grad-Itach, E., Fuchs, A. G., Lev, H., Kotok, T., Shemesh, R., Shouval, D. Ilan, Y. y Mitrani, E. (2003). Liver micro-organs transcribe albumin and clotting factors and increase survival of 92 % hepatectomized rats. *Journal of Hepatology*, 39 (4): 552-558.
38. Gershonowitz, A., Grad-Itach, E., Shouval, D., Mitrani, D., Ilan, Y., y Mitrani, E. (2004). Development of a scaled up liver device incorporating cryo-preserved pig liver micro-organs. *Journal of Hepatology*, 41 (6): 950-956.
39. Lerche-Langrand, C. y Toutain, H. (2000) Precision-cut liver slices: characteristics and use for in vitro pharmaco-toxicology. *Toxicology*, 153 (1-3): 221-253.
40. Soyer, T.; Lempinen, M. y Eiseman, B. (1973) In Vitro Extracorporeal Liver Slices and Cell Suspensions for Temporary Hepatic Support. *Annals of Surgery*, 177 (4): 393-401.
41. Yoshida, K., Matsui, Y., Wei, T., Kaibori, M., Kwon, A-H., Yamane, A. y Kamiyama, Y. (1999) A Novel Conception for Liver Preservation at a Temperature Just Above Freezing Point. *Journal of Surgical Research*, 81 (2): 216-223.
42. Fuller, B. J. (2004) Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters*, 25 (5): 375-388.
43. Meryman, H. (2007) Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion*, 47 (5): 935-945.
44. Kuleshovaa, L., Gouka, S. y Hutmacher, D. (2007) Vitrification as a prospect for cryopreservation of tissue-engineered constructs. *Biomaterials*, 28 (9): 1585-1596.
45. Hengstler, J. G., Utesch, D., Steinberg, P., Platt, K. L., Diener, B., Ringel, M., Swales, N., Fischer, T., Biefang, K., Gerl, M., Böttger, T. y Oesch, F. (2000) Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in

- vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. *Drug Metabolism Reviews*, 32 (1): 81-118.
46. Stéphenne, X., Najimi, M., Smets, F., Reding, R., De Goyet, J. y Sokal, E. M. (2005) Cryopreserved Liver Cell Transplantation Controls Ornithine Transcarbamylase Deficient Patient While Awaiting Liver Transplantation. *American Journal of Transplantation*, 5 (8): 2058-2061.
  47. Magalhaes, R., Anil Kumar, P. R., Wen, F., Zhao, X., Yu, H. y Kuleshova, L. L. (2009) The use of vitrification to preserve primary rat hepatocyte monolayer on collagen coated poly(ethylene-terephthalate) surfaces for a hybrid liver support system. *Biomaterials*, 30 (25): 4136-4142.
  48. Fisher, R., Hasal, S. J., Lipscomb, J. C., Gandolfi, A. J. y Brendel, K. (2002) Cold and cryopreservation of monkey liver slices. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 12 (2): 119-133.
  49. Matsuda, H., Yagi, T., Matsuoka, J., Yamamura, H. y Tanaka, N. (1999) Subzero Nonfreezing Storage of Isolated Rat Hepatocytes in University of Wisconsin Solution. *Transplantation*, 67 (1): 186-191.
  50. Rodríguez, J., Almada, L., Mamprin, M., Guibert, E. y Furno, G. (2009) Subzero nonfreezing storage of rat hepatocytes using modified University of Wisconsin solution (mUW) and 1,4-butanediol. I- Effects on cellular metabolites during cold storage. *Annals of Hepatology*, 8 (1): 57-62.
  51. Guibert, E., Petrenko, A., Balaban, C., Somovb, A., Rodríguez, J. y Fuller, B. (2011) Organ Preservation: Current Concepts and New Strategies for the Next Decade. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 38 (2): 125-142.
  52. van der Plaats, A., t'Hart, N., Verkerke, G. J., Leuvenink, H. G. D., Ploeg, R. J. y Rakhorst, G. (2004). Hypothermic machine preservation in liver transplantation revisited: Concepts and criteria in the new millennium. *Annals of Biomedical Engineering*, 32 (4): 623-631.

- 
53. Miskon, A., Yamaoka, T., Hyon, S-H., Kodama, M. y Uyama, H. (2009) Preservation of Porcine Hepatocytes in Three-Dimensional Bioreactor at Room Temperature Using Epigallocatechin-3-Gallate. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 15 (3): 345-353.
  54. Belzer, F. O. y Southard, J. H. (1988) Principle of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*, 45 (4): 673-676.
  55. Taylor, M. J. (2007) Biology of Cell Survival in the Cold: The Basis for Biopreservation of Tissues and Organs. En: Baust, J. G. y Baust, J. M. (Editores) *Advances in Biopreservation*, CRC, Boca Ratón, Capítulo 2: 15-62.
  56. Mamprin, M. E., Petrocelli, S., Guibert, E., and Rodriguez, J. (2008) A Novel BES-GLUCONATE-SUCROSE (BGS) Solution for cold storage of isolated hepatocytes. *CryoLetters*, 29 (2): 121-133.
  57. Hauet, T. y Eugene, M. (2008) A new approach in organ preservation: potential role of new polymers. *Kidney International*, 74 (8): 998-1003.
  58. Mandolino, C., Pizarro, M., Quintana, A., Rodríguez, J. y Mamprin, M. (2011) Hypothermic preservation of rat liver microorgans (LMOs) in Bes-Gluconate solution. Protective effects of polyethyleneglycol (PEG) on total water content and functional viability. *Annals of Hepatology*, 10 (2): 196-206.
  59. Nakao, A., Sugimoto, R., Billiar, T. y McCurry, B. (2009) Therapeutic Antioxidant Medical Gas. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 44 (1): 1-13.
  60. Motterlini, R. y Otterbein, L.E. (2010) The therapeutic potential of carbon monoxide. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9 (9): 728-743
  61. Sandouka, A., Fuller, B., Mann, B., Green, C., Foresti, R. y Motterlini, R. (2006) Treatment with CO-RMs during cold storage improves renal function at reperfusion. *Kidney International*, 69 (2): 239-247.

62. Musameh, M., Green, C., Mann, B., Fuller, B. y Motterlini, R. (2007) Improved myocardial function after cold storage with preservation solution supplemented with a carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3). *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 26 (11): 1192-1198.
63. Fuller, B. (2003) Gene expression in response to low temperatures in mammalian cells: a review of current ideas. *CryoLetters*, 24 (2): 95-102.
64. Lehninger, A., Nelson, D. y Cox, M. (1993). Oxidación de aminoácidos y producción de urea. En: *Principios de Bioquímica*, 2<sup>da</sup> Edición, Ediciones Omega S.A., Barcelona, Capítulo 17: 506-539.
65. Ampola, M. (1994) The urea cycle. Enzymes and defects. En: Arias, I.M., Boyer, J. L., Fauston, N., Jakoby, W. B., Schachter, D. A. y Shafritz, D. A. (Editores) *The liver biology and pathobiology*, 3<sup>ra</sup> Edición, Editorial Raven Press Ltd., Nueva York, pp 365-366.
66. Power-Lee, S. y Meister, A. (1988) Urea synthesis and ammonia metabolism. En: Arias, L. M., Jakoby, W. B., Popper, H., Schachter, D. y Shafritz, D. A. (Editores) *The liver biology and pathobiology*, 2<sup>da</sup> Edición, Editorial Raven Press Ltd., Nueva York, pp 317-329.
67. Martín-Hernández, I. (2005) Una aproximación a los desórdenes hereditarios del ciclo de la urea en el hombre. *Revista Biomédica*, 16 (3): 193-206.
68. Shore, G., Rachubinski, R., Argan, C., Rozen, R., Pouchelet, M., Lusty, C. y Raymond, Y. (1978) Synthesis and intracellular transport of mitochondrial matrix proteins in rat liver: Studies in vivo and in vitro. *Methods in Enzymology*, 97: 396-408.
69. Ryall, J., Nguyen, M., Bendayan, M. y Shore, G. (1985) Expression of nuclear genes encoding the urea cycle enzymes, carbamoyl-phosphate synthetase I and ornithine carbamoyl transferase, in rat liver and intestinal mucosa. *European Journal of Biochemistry*, 152 (2): 287-292.



70. Planchamp, C., Vu, T., Mayer, J., Reist, M. y Testa, B. (2003) Hepatocyte hollow-fibre bioreactors: design, set-up, validation and applications. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55 (9): 1181-1198.
71. Iwata, H., Sajiki, T., Maeda, H., Park, Y., Zhu, B., Satoh, S., Uesugi, T., Ikai, I., Yamaoka, Y. e Ikada, Y. (1999) In vitro evaluation of metabolic functions of a bioartificial liver. *ASAIO Journal*, 45 (4): 299-306
72. Allen, J., Hassanein, T. y Bhatia, S. (2001) Advances in Bioartificial Liver Devices. *Hepatology*, 34 (3): 447-455.
73. Strain, A. y Neuberger, J. (2002) A Bioartificial Liver – State of the Art. *Science*, 295 (5557): 1005-1009.
74. Drioli, E. y De Bartolo, L. (2006) Membrane Bioreactor for Cell Tissues and Organoids. *Artificial Organs*, 30 (10): 793-802.
75. Meuwly, F., Ruffieux, P-A., Kadouri, A. y van Stockar, U. (2007) Packed-bed bioreactors for mammalian cell culture: Bioprocess and biomedical applications. *Biotechnology Advances*, 25 (1): 45-56.
76. Yang, M., Vacanti, J. e Ingber, D. (1994) Hollow fibers for hepatocyte encapsulation and transplantation: studies of survival and function in rats. *Cell Transplantation*, 3 (5): 373-385.
77. Yu, S-H., Buchholz, B. y Kim, S-K. (1999) Encapsulation of rat hepatocyte spheroids for the development of artificial liver. *Biotechnology Techniques*, 13 (9): 609-614.
78. Tilles, A., Berthiaume, F., Yarmush, M. y Toner, M. (2002) Critical issues in bioartificial liver development. *Technology and Health Care*, 10 (3-4): 177-186.
79. Jasmund, I. y Bader, A. (2002) Bioreactor Developments for Tissue Engineering Applications by the Example of the Bioartificial Liver. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 74 (XVIII): 99-109.

80. Morsiani, E., Brogli, M., Galavotti, D., Bellini, T., Ricci, D., Pazzi, P. y Puviani, A. C. (2001) Long-Term Expression of Highly Differentiated Functions by Isolated Porcine Hepatocytes Perfused in a Radial-Flow Bireactor. *Artificial Organs*, 25 (9): 740-748.
81. De Bartolo, L. y Bader, A. (2002) Development of a hybrid liver-support device. *Minimally Invasive Therapy & Allied Technology*, 11 (3): 123-134.
82. Seifert, B., Mihanetzis, G., Groth, T., Albrecht, W., Richau, K., Missirlis, Y., Paul, D. y von Sengbusch, G. (2002) Polyetherimide: A New Membrane-Forming Polymer for Biomedical Applications. *Artificial Organs*, 26 (2): 189-199.
83. Conde Olasagasti, J. y Amate Blanco, J. M. (1996) Evaluación de los diferentes tipos de membranas de Hemodiálisis. Informe del Ministerio de Sanidad y Consumo - Instituto de Salud Carlos III - Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias (AETS), Madrid, pp. 31-34.
84. Groth, T., Seifert, B., Albrecht, W., Malscha, G., Gross, U., Fey-Lamprecht, F., Michanetzis, G., Missirlis, Y. y Engbers, G. (2005) Development of polymer membranes with improved haemocompatibility for biohybrid organ technology. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 32 (2): 129-143.
85. Kinasiewicz, A., Smietanka, A., Gajkowska, B. y Werynski, A. (2008) Impact of Oxygenation of Bioartificial Liver Using Perfluorocarbon Emulsion Perftoran on Metabolism of Human Hepatoma C3A Cells. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 36 (6): 525-534.
86. Allen, J. y Bhatia, S. (2003) Formation of Steady-State Oxygen Gradients In Vitro. Application to Liver Zonation. *Biotechnology and Bioengineering*, 82 (3): 253-262.

- 
87. Hay, P., Veitch, A. y Gaylor, J. (2001) Oxygen Transfer in Convection-Enhanced Hollow Fiber Bioartificial Liver. *Artificial Organs*, 25 (2): 119-130.
  88. Sullivan, J., Harris, D. y Palmer, A. (2008) Convection and Hemoglobin-Based Oxygen Carrier Enhanced Oxygen Transport in a Hepatic Hollow Fiber Bioreactor. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 36 (6): 386-402.
  89. Hung, K-C., Yong, C-C., Chen, Y-S., Eng, H-L., Kuo, F-Y., Lin, C-C., Young, T-H., Kobayashi, E., Chen, C-L. y Wang, C-C. (2007) A surgical model of fulminant hepatic failure in rabbits. *Liver International*, 27 (10): 1333-1341.
  90. van de Kerkhove, M., Hoekstra, R., van Gulik, T. y Chamuleau, R. (2004) Large animal models of fulminant hepatic failure in artificial and bioartificial liver support research. *Biomaterials*, 25 (9): 1613-1625.
  91. Nagamori, S., Hasumura, S., Matsuura, T., Aizaki, H. y Kawada, M. (2000) Developments in bioartificial liver research: concepts, performance, and applications. *Journal of Gastroenterology*, 35 (7): 493-503.
  92. Matsumura, K., Guevara, G., Huston, H., Hamilton, W. L., Rikimaru, M., Yamasaki, G. y Matsumura, M. S. (1987) Hybrid bioartificial liver in hepatic failure: preliminary clinical report. *Surgery*, 101 (1): 99-103.
  93. Demetriou, A., Brown, R. S. Jr, Busuttil, R. W., Fair, J., McGuire, B. M., Rosenthal, P., Am Esch, J. S., Lerut, J., Nyberg, S. L., Salizzoni, M., Fagan, E. A., de Hemptinne, B., Broelsch, C. E., Muraca, M., Salmeron, J. M., Rabkin, J. M., Metselaar, H. J., Pratt, D., De La Mata, M., McChesney, L. P., Everson, G. T., Lavin, P. T., Stevens, A. C., Pitkin, Z. y Solomon, B. A. (2004) Prospective, Randomized, Multicenter, Controlled Trial of a Bioartificial Liver in Treating Acute Liver Failure. *Annals of Surgery*, 239 (5): 660-670.

94. Sussman, N., Gislason, G., Conlin, C. y Kelly, J. (1994) The Hepatix extracorporeal liver assist device: initial clinical experience. *Artificial Organs*, 18 (5): 390-396.
95. Mazariegos, G., Patzer II, J. F., Lopez, R. C., Giraldo, M., DeVera, M. E.; Grogan, T. A., Zhu, Y., Fulmer, M. L., Amiot, B. P. y Kramer, D. J. (2002) First Clinical Use of a Novel Bioartificial Liver Support System (BLSS). *American Journal of Transplantation*, 2 (3): 260-266.
96. Flendrig, L., la Soe, J., Jörning, G., Steenbeek, A., Karlsen, O., Bovée, W., Ladiges, N., te Velde, A. y Chamuleau, R. (1997) In vitro evaluation of a novel bioreactor based on an integral oxygenator and a spirally wound nonwoven polyester matrix for hepatocyte culture as small aggregates. *Journal of Hepatology*, 26 (6): 1379-1392.
97. van de Kerkhove, M-P., Hoekstra, R., Chamuleau, R. A. y van Gulik, T. M. (2004) Clinical Application of Bioartificial Liver Support Systems. *Annals of Surgery*, 240 (2): 216-230.
98. Van de Werve, G. (1980). Isolation and characteristics of hepatocytes. *Toxicology*, 18 (3): 179-185.
99. Benford, D. J. y Hubbard, S. A. (1987) Preparation and culture of mammalian cells. En: Snell, K. y Mullock, B. (Editores) *Biochemical toxicology: a practical approach*, IRL Press, Oxford, pp. 57-82.
100. Lagadic-Gossman, D., Rissel, M., Le Bot, M.A. y Guillouzo, A. (1998) Toxic effects of tacrine on primary hepatocytes and liver epithelial cells in culture. *Cell Biology and Toxicology*, 14 (5): 361-373.
101. Carr, R. S. y Neff J. M. (1984) Quantitative semi-automated enzymatic assay for tissue glucogen. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 77 (B): 447-449.
102. Bilzer, M. y Gerbes, A. (2000) Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *Journal of Hepatology*, 32 (3): 508-515.

103. Robinson, J. y Cooper, J. M. (1970) Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. *Analytical Biochemistry*, 33 (2): 390-399.
104. Marenzi, A. D., Villonga, F. A. S. (1947) Volumen de líquido extracelular y agua total. En: *Bioquímica Analítica Cuantitativa*, Editorial El Ateneo, Buenos Aires, Capítulo 7: 144-153.
105. Swan, A. G. y Millar, A. T. (1960). Osmotic regulation in isolated liver and kidney slices. *American Journal of Physiology*, 99 (6): 1227-1231.
106. Pierson, D. L. (1980) A rapid colorimetric assay for Carbamyl Phosphate Sybthetase I. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 3 (1): 31-37.
107. Ceriotti, G. (1974) Ornithine Carbamoyltransferase. En: Bergmeyer, H. U. (Editor) *Methods in Enzymatic Analyze*, 2<sup>da</sup> Edición, Verlag Chemie, Weinheim/Bergsts, Vol. 2, pp. 691-698.
108. Lee, W. M. (1996) Management of acute liver failure. *Seminars in Liver Disease*, 16 (4): 369-378.
109. Rao, K. V. y Noremberg, M. D. (2001) Cerebral energy metabolism in Hepatic Encephalopathy and hyperammonemia. *Metabolic Brain Disease*, 16 (1-2): 67-78.
110. van Anken, H. C. y Schiphorst, M. E. (1974) Kinetic determination of ammonia in plasma. *Clinica Chimica Acta*, 56 (2): 151-157.
111. Rahmatullah, M. y Boyde, T. R. C. (1980) Improvements in the determination of urea using diacetyl monoxime; methods with and without deproteinization. *Clinica Chimica Acta*, 107 (1-2): 3-9.
112. Clark, J. E., Naughton, P., Shurey, S., Green, C. J., Johnson, T. R., Mann, B. E., Foresti, R. y Motterlini, R. (2003) Cardioprotective actions by a water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. *Circulation Research*, 93 (2): e2-e8.

113. Rodríguez, J. V. (2003) El Hígado Bioartificial. En: Méndez-Sánchez, N. y Uribe Esquivel, M. (Editores) Conceptos actuales en hepatología, Editorial Masson Daymo, México, Capítulo 48: 427-437.
114. Rodríguez, J. V., Pizarro, M. D., Scandizzi, A. L., Guibert, E. E., Almada, L. L. y Mamprin, M. E. (2008) Construction and Performance of a Minibioreactor Suitable as Experimental Bioartificial Liver. *Artificial Organs*, 32 (4): 323-328.
115. Kalinov, A. (1975) Normas y sugerencias para el estudio de la sangre. El laboratorio y su interpretación semiológica, pp. 408.
116. Arnaud, F. G., Khirabadi, B. S. y Fahy, G. M. (2002), Normothermic blood perfusion of isolated rabbit kidneys. *Transplant International*, 15 (6): 278-289.
117. Clark, W. R. (2001) Quantitative Characterization of Hemodialyzer Solute and Water Transport. *Seminars in Dialysis*, 14 (1): 32-36.
118. Schneider, M., Reymond, F., Marison, I. W. y von Stockar, U. (1995) Bubble-free oxygenation by means of hydrophobic porous membranes. *Enzyme and Microbial Technology*, 17 (9): 839-847.
119. Gnaiger, E. (2001-2004) Oxygen solubility in experimental media. *Mitochondrial Physiology Network*, 6: 1-6. Disponible en: <http://www.oroboros.at/index.php?oxygen-solubility>.
120. Kawahito, S., Maeda, T., Takano, T., Nonaka, K., Linneweber, J., Mikami, M., Motomura, T., Ichikawa, S., Glueck, J., Sato, K., Kuwana, J. and Nosé, Y. (2001) Gas Transfer Performance of a Hollow Fiber Silicone Membrane Oxygenator: Ex Vivo Study. *Artificial Organs*, 25 (6): 498-502.
121. Hall, J. E. (2011) Transporte de oxígeno y dióxido de carbono en la sangre y líquidos titulares. En: Guyton-Hall, Tratado de fisiología médica, 12<sup>da</sup> Edición, Elsevier, Barcelona, Capítulo 40: 495-506.
122. Price, R., Ball, S., Renwick, A., Barton, P., Beamand, J. y Lake. B. (1998) Use of precision-cut rat liver slices for studies of xenobiotic metabolism

- and toxicity: comparison of Krumdieck and Brendel tissue slicers. *Xenobiotica*, 28 (4): 361-371.
- 123.** 't Hart, N., van der Plaats, A., Faber, A., Leuvenink, H., Olinga, P., Wiersema-Buist, J., Verkerke, G., Rakhorst, G. y Ploeg, R. (2005) Oxygenation During Hypothermic Rat Liver Preservation: an In Vitro Slice Study to Demonstrate Beneficial or Toxic Oxygenation Effects. *Liver Transplantation*, 11 (11): 1403-1411.
- 124.** Wormser, U., Ben Zakine, S., Stivelband, E., Eizen, O. y Nyska, A. (1990) The liver slice system: A rapid in vitro acute toxicity test for primary screen of hepatotoxic agents. *Toxicology In Vitro*, 4 (6): 783-789.
- 125.** Marsh, D.C., Hjelmhaug, J.A., Vreugdenhil, P.K., Kerr, J.A., Rice, M.J., Belzer, F.O. y Southard, J.H. (1990). Hypothermic Preservation of Hepatocytes. III. Effects of Resuspension Media on Viability after up to 7 days of Storage. *Hepatology*, 13 (3): 500-508.
- 126.** Rademacher, S., Oppert, M. y Jörres, A. (2011) Artificial extracorporeal liver support therapy in patients with severe liver failure. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 5 (5): 591-599.
- 127.** Bach, P. H., Vickers, A. E. M., Fisher, R., Baumann, A., Brittebo, E., Carlile, D. J., Koster, M. J., Lake, B. G., Salmon, F., Sawyer, T. W. y Skibinski, G. (1996). The Use of Tissue Slices for Pharmacotoxicology Studies. The Report and recommendations of ECVAM Workshop 20. *Atla*, 24: 893-923.
- 128.** Desmard, M., Boczkowski, J., Poderoso, J. y Motterlini, R. (2007) Mitochondrial and cellular heme-dependent proteins as targets for the bioactive function of the heme oxygenase/carbon monoxide system. *Antioxidant & Redox Signaling*, 9 (12): 2139-2155.
- 129.** Pizarro, M. D., Rodriguez, J. V., Mamprin, M. E., Fuller, B. J., Mann, B. E., Motterlini, R. y Guibert, E. E (2009) Protective effects of a carbon

- monoxide-releasing molecule (CORM-3) during hepatic cold preservation. *Cryobiology*, 58 (3): 248-255.
130. Ikeda, A., Ueki, S., Nakao, A., Tomiyama, K., Ross, M. A., Stolz, D. B., Geller, D. A. y Murase, N. (2009) Liver graft exposure to carbon monoxide during cold storage protects sinusoidal endothelial cells and ameliorates reperfusion injury in rats. *Liver Transplantation*, 15 (11): 1458-1468.
131. Allen, J. W. y Bhatia, S. N. (2002) Improving the next generation of bioartificial liver devices. *Cell & Developmental Biology*, 13 (6): 447-454.
132. Calligaris, S. D., Almada, L. L., Guibert, E. E., Tiribelli, C. y Rodriguez, J. V. (2002) Ammonium Detoxifying Activity is maintained after 72 hs of cold preservation of hepatocytes in University of Wisconsin (UW) Solution. *CryoLetters*, 23 (4): 245-253.
133. Beyer, H., Barluenga Mur, J. y Walter, W. (1987) Hidratos de carbono, Capítulo II: Compuestos alicíclicos, Parte Especial. En: *Manual de Química Orgánica*, Editorial Reverté, Barcelona.
134. Sigdell, J. E. (1995) Operating Characteristics of Hollow-fiber Dialyzers. En: *Clinical Dialysis*, 2<sup>da</sup> Edición, Appleton & Lange, USA, Capítulo 5: 97-117.
135. Seymour, R. y Carraher, Ch. (1995) Reacciones de polimerización escalonada o reacciones de policondensación. En: *Introducción a la química de los polímeros*, 3<sup>ra</sup> edición, Editorial Reverté, Barcelona, Capítulo 7.
136. Olinga, P., Hofa, I. H., Meremaa, M. T., Smita, M., de Jagera, M. H., Swarta, P. J., Slooff, M. J. H., Meijera, D. K. F. y Groothuisa, G. M. M. (2001) The applicability of rat and human liver slices to the study of mechanisms of hepatic drug uptake. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 45 (1): 55- 63.



- 137.** Madadlou, A., O' Sullivan, S. y Sheehan, D. (2011) Fast protein liquid chromatography. En: Walls, D. y Loughran, S. T. (Editores), Protein Chromatography: Methods and Protocols, Humana Press, Methods in Molecular Biology, 681, Capítulo 25: 439-47.